

DELPHION51457-2000300-10361
**RESEARCH** **PRODUCTS** **INSIDE DELPHION**[Logout](#) [My Files](#) [Saved Searches](#)[My Account](#)

Search: Quick/Number Boolean Advanced Denwent Help

The Delphion Integrated View: INPADOC Record[Get Now: PDF | More choices...](#)Tools: Add to Work File: [Create new Work File](#) [Add](#)View: Jump to: [Top](#) Go to: [Denwent](#)[!\[\]\(4b7a79268f6ba26c1471d4232fffa85a_img.jpg\) Email this to a friend](#)**⑧ Title:** **CN1325490A: Method of electrochemical analysis of an analyte**

⑧ Derwent Title: Sensing electrode for electrochemical detection, used for e.g. detecting nucleic acid or antigens, comprises layer of conductive polymer containing adaptor molecule for analyte capture [Denwent Record]

⑧ Country: CN China**⑧ Kind:** A Unexamined APPLIC. open to Public inspection i (See also: [CN1325490T](#))

⑧ Inventor: D.A. FARMAKOVSKI; United Kingdom
Y. Y. MILANOVSKI; United Kingdom
V.R. CHERKASOV; United Kingdom

⑧ Assignee: SENSOR-TECH LIMITED United Kingdom
[News](#), [Profiles](#), [Stocks](#) and [More about this company](#)

⑧ Published / Filed: 2001-12-05 / 1999-08-24**⑧ Application Number:****⑧ IPC Code:** G01N 33/543; G01N 27/327; C12Q 1/28; C12Q 1/58; C12Q 1/68;**⑧ ECLA Code:** G01N33/543K2B;**⑧ Priority Number:** 1998-08-24 RU1998000116346**⑧ INPADOC Legal Status:** None [Get Now: Family Legal Status Report](#)

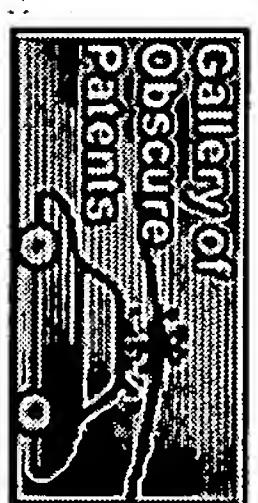
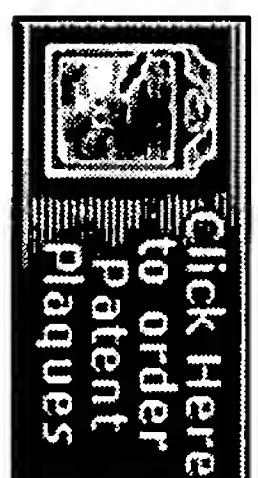
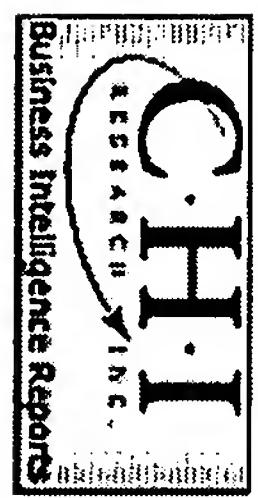
High Resolution

⑧ Family:	PDF	Publication	Pub. Date	Filed	Title
		WO0011473A1	2000-03-02	1999-08-24	METHOD OF ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF AN ANALYTE
		US6770190	2004-08-03	2001-05-29	Method of electrochemical analysis of an analyte

RU2161653C2	2001-01-10	1998-08-24	METHOD OF QUANTITATIVE ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF BIOLOGICAL MOLECULES
JP2002523746T2	2002-07-30	1999-08-24	
GB2347223B	2003-03-26	1999-08-24	METHOD OF ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF AN ANALYTE
GB2347223A1	2000-08-30		
GB2347223A	2000-08-30	1999-08-24	METHOD OF ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF AN ANALYTE
GB0012057A	2000-07-12		
EP1108213A1	2001-06-20	1999-08-24	METHOD OF ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF AN ANALYTE
CN1325490T	2001-12-05	1999-08-24	Method of electrochemical analysis of an analyte
CN1325490A	2001-12-05	1999-08-24	Method of electrochemical analysis of an analyte
CN1135390C	2004-01-21	1999-08-24	Method of electrochemical detection for analyte in sample
AU5437999A1	2000-03-14	1999-08-24	METHOD OF ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF AN ANALYTE

8 Other Abstract Info:

None



[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

Copyright © 1997-2005 The Thomson Corporation

THOMSON

*



[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

G01N 33/543

G01N 27/327 C12Q 1/28

C12Q 1/58 C12Q 1/68

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 99812547.4

[43]公开日 2001年12月5日

[11]公开号 CN 1325490A

[22]申请日 1999.8.24 [21]申请号 99812547.4

[30]优先权

[32]1998.8.24 [33]RU [31]98116346

[86]国际申请 PCT/GB99/02785 1999.8.24

[87]国际公布 WO00/11473 英 2000.3.2

[85]进入国家阶段日期 2001.4.24

[71]申请人 传感技术有限公司

地址 英国海峡群岛

[72]发明人 D·A·法马科夫斯基

Y·Y·米拉诺夫斯基

V·R·彻尔卡索夫

Y·S·比尔于科夫

O·莱奥纳多瓦

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

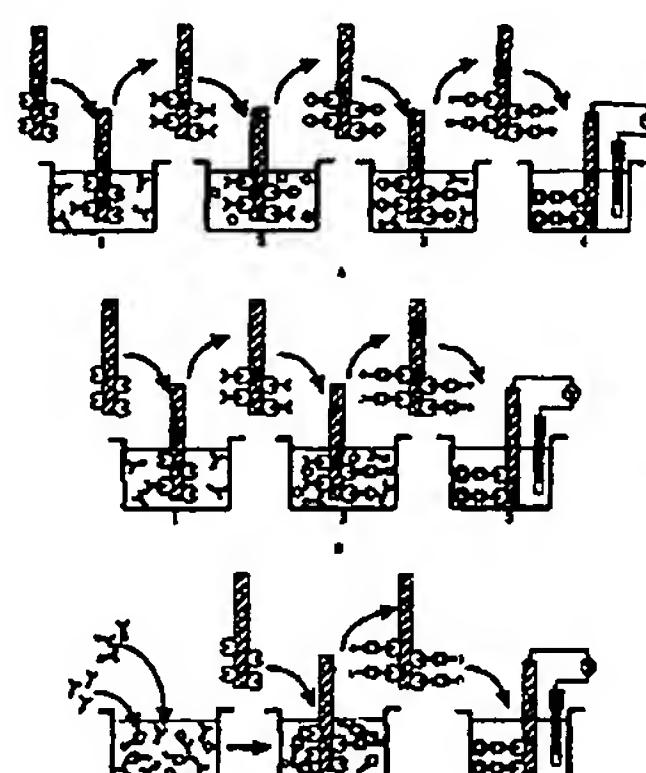
代理人 卢新华 王其灏

权利要求书6页 说明书40页 附图页数4页

[54]发明名称 被分析物的电化学分析方法

[57]摘要

一种用于电化学检测被分析物方法的感应电极，该感应电极包括一种涂有含一种被固定在其中或被吸附在其上的衔接分子的导电聚合物膜的导电电极，这些衔接分子选自抗生素蛋白质、抗生蛋白链菌素、抗-FTTC抗体。通过该衔接分子与对被分析物特异性受体的结合，可将该感应电极制成对受测被分析物特异性的。



ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种用于被分析物的电化学检测方法的感应电极，该感应电极包括一种涂有含衔接分子的导电聚合物层的导电电极，这些衔接分子选自抗生物素蛋白质、抗生蛋白链菌素、抗-FITC抗体和一种能够特异性结合在至少一类被固定在其中或被吸附在其上的受体分子上的分子。
5
2. 如权利要求1的感应电极，其中的导电聚合物层已经掺杂大离子半径的阴离子。
10
3. 如权利要求1或2的感应电极，其中的衔接分子是抗生物素蛋白质或者抗生蛋白链菌素，经由生物素 / 抗生物素蛋白质或者生物素 / 抗生蛋白链菌素结合相互作用能与所述被分析物结合的生物素化受体附着其上。
15
4. 如权利要求1或2的感应电极，其中的衔接分子是蛋白质A或者蛋白质G，经由蛋白质A / 抗体或者蛋白质G / 抗体结合相互作用能与所述被分析物结合的抗体附着其上。
15
5. 如权利要求1或2的感应电极，其中的衔接分子是外源凝集素，经由外源凝集素 / 碳水化合物结合相互作用能与所述被分析物结合的受体附着其上。
20
6. 如权利要求1或2的感应电极，其中的衔接分子是抗-FITC抗体，经由 FITC / 抗-FITC结合相互作用能与所述被分析物结合的受体附着其上。
20
7. 一种包括权利要求1至6中任一项的感应电极和参比电极的电极装置。
25
8. 一种用于电化学检测被分析物方法的感应电极的制备方法，该感应电极包括一种涂有含衔接分子的导电聚合物层的导电电极，这些衔接分子选自抗生物素蛋白质、抗生蛋白链菌素、抗-FITC抗体和一种能够特异性结合在至少一类被固定在其中的受体分子上的分子，该方法包括下列步骤：
 - (a) 制备一种含有导电聚合物单体和衔接分子的电化学聚合溶液，
25
 - (b) 将欲涂制的电极浸入该电化学聚合溶液中，和
30
 - (c) 在该电极和该电化学聚合溶液之间施加一种循环电势，通过该溶液中聚合物的电化学合成涂制该电极，所施加的循环电势至少为一个全循环。
9. 一种用于电化学检测被分析物方法的感应电极的制备方法，该感应电极包括一种涂有含衔接分子的导电聚合物层的导电电极，这些衔接分子选自抗生物素蛋白质、抗生蛋白链菌素、抗-FITC抗体和一种能够特异性结合在至

少一类被固定在其中或被吸附在其上的受体分子上的分子，该方法包括下列步骤：

- (a) 制备一种含有导电聚合物单体的电化学聚合溶液，
- (b) 将欲涂制的电极浸入该电化学聚合溶液中，
- 5 (c) 在该电极和该电化学聚合溶液之间施加一种循环电势，通过该溶液中聚合物的电化学合成来涂制该电极，所施加的循环电势至少为一个全循环；和
- (d) 将该涂制电极与一种含有衔接分子的溶液接触，以使该衔接分子被吸附在该电极的导电聚合物涂层上。

10 10. 如权利要求8或9的方法，其中的衔接分子是抗生物素蛋白质或者抗生蛋白链菌素，以及该方法更进一步包括将该感应电极与一种含受体分子的溶液接触，该受体分子与生物素缀合，以使该生物素化的受体经由生物素/抗生物素蛋白质或者生物素/抗生蛋白链菌素结合相互作用，与被固定在或被吸附至该电极的导电聚合物涂层上的抗生物素蛋白质或抗生蛋白链菌素分子结合。

15 11. 如权利要求10的方法，其中的受体分子是单克隆抗体、多克隆的抗体、抗体碎片、抗体仿制品、嵌合抗体病毒溶菌产物、重组蛋白质、合成肽、激素、激素受体、单股核酸、低分子量分子、与半抗原蛋白质缀合的化学化合物、细菌碎片、植物或者动物细胞、外源凝聚素、糖蛋白或者碳水化合物。

20 12. 如权利要求8或9的方法，其中的衔接分子是蛋白质A、蛋白质G或者外源凝集素。

13. 如权利要求8至12中任一项的方法，其中的循环电势具有一种锯齿形式。

25 14. 如权利要求8至13中任一项的方法，其中所施加的循环电势至少为2个循环。

15. 如权利要求8至14中任一项的方法，其中施加在电极的循环电势的峰值小于或等于+2伏特。

16. 如权利要求8至13中任一项的方法，其中具有大离子半径的阴离子的盐类被加至该电化学聚合溶液中。

30 17. 如权利要求16的方法，其中的盐类是十二烷基硫酸钠或者葡聚糖硫酸钠。

18. 如权利要求8至17中任一项的方法，其中的导电聚合物单体是苯胺、

塞吩、呋喃或吡咯。

19. 一种样品中的被分析物的电化学检测方法，该方法包括下列步骤：

(a) 提供一种具有导电聚合物涂层的感应电极，该涂层含有被固定于其中或者被吸附于其上的能够与样品中待测的目的被分析物结合的受体；

5 (b) 将该感应电极与含有样品的试液接触，以使该目的被分析物与所述被固定或者被吸附的受体结合；

(c) 将该感应电极与一种含有次级受体的溶液接触，该次级受体能够与该被分析物在空间上不同于被固定或者被吸附的受体的结合位点的位点上结合，并且该次级受体与一种电荷标记物缀合；

10 (d) 当处理过的感应电极与参比电极浸入一种电解液中时，监测两者之间的电势差；和

(e) 在恒定pH值下，该电解液的离子强度改变之后，监测该感应电极与参比电极之间的电势差。

20. 一种样品中的被分析物的电化学检测方法，该方法包括下列步骤：

(a) 提供一种具有导电聚合物涂层的感应电极，该涂层具有被固定于其中或者被吸附于其上的能够与样品中目的待测的被分析物结合的受体；

(b) 将该感应电极与含有样品的试液接触，以使该被分析物与所述被固定的或者被吸附的受体结合；

20 (c) 将该感应电极与一种含有竞争分子的溶液接触，该竞争分子能够与被固定的或者被吸附的受体结合，并与一种电荷标记物缀合；

(d) 当处理过的感应电极与参比电极浸入一种电解液中时，监测两者之间的电势差；和

(e) 在恒定pH值下，改变电解液的离子强度之后，监测感应电极与参比电极之间的电势差。

25 21. 如权利要求19或20的方法，其中的电荷标记物具有下列性质：

(i) 它在(d)部分电解液的pH值下携带净电荷；和

(ii) 在恒定pH值下，该电荷数量随该电解液离子强度的变化而变化。

22. 如权利要求21的方法，其中的电荷标记物是二茂铁、胶乳微球体或金。

30 23. 如权利要求19至22中任一项的方法，其中的步骤(b)和(c)是通过将感应电极与已经加入与电荷标记物缀合的次级受体或者竞争分子的试液接触而同时进行。

24. 一种样品中的被分析物的电化学检测方法，该方法包括下列步骤：

(a) 提供一种具有导电聚合物涂层的感应电极，该涂层含有被固定于其中或者被吸附于其上的能够与样品中目的待测被分析物结合的受体；

5 (b) 将该感应电极与含有样品的试液接触，以使所述被分析物与所述被固定的或者被吸附的受体结合；

(c) 将该感应电极与一种含有次级受体的溶液接触，该次级受体能够与该被分析物在空间上不同于与被固定或者被吸附的受体的结合位点的位点上结合，并且该次级受体与一种酶缀合；

10 (d) 当处理过的感应电极与参比电极浸入一种电解液中时，监测两者之间的电势差；和

(e) 在暴露于一种含有所述酶的底物的电解液之后，监测该感应电极与参比电极之间的电势差。

25. 一种样品中的被分析物的电化学检测方法，该方法包括下列步骤：

15 (a) 提供一种具有导电聚合物涂层的感应电极，该涂层含有被固定于其中或者被吸附于其上的能够与样品中的目的待测被分析物结合的受体；

(b) 将该感应电极与含有样品的试液接触，以使该目的被分析物与所述被固定的或者被吸附的受体结合；

(c) 将该感应电极与一种含有竞争分子的溶液接触，该竞争分子能够与被固定的或者被吸附的受体结合，并与一种酶缀合；

20 (d) 当处理过的感应电极与参比电极浸入一种电解液中时，监测两者之间的电势差；和

(e) 在暴露于一种含有所述酶的底物的电解液之后，监测该感应电极与参比电极之间的电势差。

26. 如权利要求24或者25的方法，其中的酶能够将一种直接影响感应电极的导电聚合物涂层的氧化还原组成的底物转换成一种对所述导电聚合物涂层的氧化还原组成没有可测影响的产物。

27. 如权利要求26的方法，其中的酶是过氧化酶。

28. 如权利要求24或者25的方法，其中的酶能够将一种对感应电极的导电聚合物涂层的氧化还原组成没有可检测影响的底物转换成能够直接或者间接影响所述导电聚合物涂层的氧化还原组成的产物。

29. 如权利要求28的方法，其中能够间接影响导电聚合物膜的氧化还原组成的产物导致(e)部分电解液的pH值变化。

30. 如权利要求29的方法，其中的酶是脲酶。

31. 如权利要求24或者25的方法，其中酶能够将一种对感应电极的导电聚合物涂层的氧化还原组成没有可检测作用的底物转换成第二种酶的底物，第二种酶的作用是产生一种直接或者间接影响该导电聚合物涂层的氧化还原组成的第二种产物。
5

32. 如权利要求24至31中任一项的方法，其中的步骤(b)和(c)是通过将感应电极与已经添加与一种酶标记物缀合的次级受体或者竞争分子的试液接触而同时进行。

33. 如权利要求19至32中任一项的方法，其中能够与待检测的被分析物结合的受体是被生物素化的并附着于经由生物素/抗生素蛋白质或者生物素/抗生蛋白链菌素结合相互作用固定在或者吸附至感应电极的导电聚合物涂层上的抗生素蛋白质或者抗生蛋白链菌素上。
10

34. 如权利要求19至32中任一项的方法，其中能够与待检测的被分析物结合的受体是抗体，并附着于经由蛋白质A/抗体或者蛋白质G/抗体结合相互作用固定在或者吸附至感应电极的导电聚合物涂层上的蛋白质A或者蛋白质G上。
15

35. 如权利要求19至32中任一项的方法，其中能够与待检测的被分析物结合的受体包含糖部分，并附着于经由外源凝集素/糖结合相互作用固定在或者吸附至感应电极的导电聚合物涂层上的外源凝集素上。

36. 如权利要求19至32中任一项的方法，其中能够与待检测的被分析物结合的受体是用FITC标记的，并附着于经由FITC/抗-FITC结合相互作用固定在或者吸附至感应电极的导电聚合物涂层上的抗-FITC抗体上。
20

37. 如权利要求19至36中任一项的方法，其中的感应电极是根据权利要求8至18中任一项的方法生产的。

38. 如权利要求33的方法，其中的步骤(b)和(c)与接触含有生物素化受体的感应电极的步骤同时进行，该含有生物素化受体的感应电极是通过将感应电极与已经添加与电荷标记物或者酶缀合的生物素化受体和次级受体或者竞争分子的试液接触而得到的。
25

39. 如权利要求19的方法，其中的次级受体是多克隆抗体或者单克隆抗体。
30

40. 如权利要求19至39中任一项的方法，其中的生物学流体如全血、血清、淋巴、尿、唾液、脑脊髓液流体和精液被用作试液。

41. 一种样品中的被分析物的电化学检测方法，该方法包括下列步骤：

(a) 提供一种含有导电聚合物涂层的导电电极的感应电极，该涂层含有被固定在其中或者被吸附在其上的抗生素素蛋白质或者抗生蛋白链菌素分子，经由生物素 / 抗生素素蛋白质或者生物素 / 抗生蛋白链菌素相互作用而附着于受体分子上，被附着于受体分子上的抗生素素蛋白质或者抗生蛋白链菌素分子能够与待测的被分析物结合；
5

(b) 将该感应电极与含有样品的试液接触，以使该目的被分析物与所述被固定或者被吸附的受体分子结合；

(c) 当将感应电极与参比电极浸入电解液之中时，监测感应电极相对于参比电极的电势差；和
10

(d) 在恒定 pH 值下，改变电解液的离子强度或者组成之后，监测该感应电极相对于参比电极的电势差。

42. 权利要求 41 的方法，其中的待测被分析物是核酸，并且受体分子是低聚核苷酸。

说 明 书

被分析物的电化学分析方法

5 本发明涉及被分析物的电化学检测方法以及该方法中所使用的感应电极。

用生物传感器对生物流体中的被分析物如各种抗原、抗体、DNA分子等的电化学分析，是最有前途和吸引力的仪器分析方法之一。对该领域持续不减的兴趣和大量的出版物是由于该方法有许多基本优点，即高灵敏度、简便，
10 以及采用相对简单而廉价的设备。

本领域众所周知，生物传感器装置的设计是基于采用导电聚合物膜，如聚吡咯或聚噻吩，这种膜将与被分析物的存在相关的化学信号变成可测量的电信号（参见[1]和[2]）。

EP -A-0 193 154描述了一种电化学检测使用的电极，该电极的表面被涂以聚吡咯或聚噻吩膜。与待测的被分析物互补的生物受体被吸附到聚合后的导电聚合物膜表面上。WO 89 11649描述了另一种生产电化学分析中所用的聚合物电极的方法。在该方法中，含有所需结合特异性的生物受体分子在聚合期间被引入导电聚合物膜中。采用EP-A-0 193 154和WO 89/11649中所描述的方法，对于每个给定的分析，必须合成不同的感应电极，在该电极上含有能够特异性结合欲测被分析物的固定化生物受体。
15
20

PCT申请人公开的申请PCT/GB98/00548描述了一种电化学分析的电势测定方法，该方法使用的电化学感应电极包括金属电势电极又覆以包含与受测被分析物特异性结合的固定化生物受体分子的导电聚合物层。该被分析物的存在是通过被分析物结合至该固定化生物受体时，该感应电极表面电荷的变化而显示出来的。被分析物的检测是通过下列过程进行的：首先安装包括感应电极和参比电极的电化学电池，将这两个电极通过浸于固定pH值的工作缓冲溶液中的测量装置相连。首先记录感应电极和参比电极之间电势差的基值，然后将感应电极和参比电极与包含被分析物、具有较高离子强度但与工作缓冲溶液相同pH值的溶液相接触，并再次记录电势差。最后将该感应电极和参比电极转至干净的工作缓冲溶液中，并再次记录电势。在恒定的pH值下，
25 由于被分析物存在，离子强度变化引起的感应电极和参比电极之间电势差的变化与被分析物的浓度成正比。
30

如参考文献[13、14、15、16]和[3]中所示，具有含生物受体聚合物膜的

感应电极对周围溶液离子强度的阶段变化(所谓“离子阶段”步骤)的响应(电势变化的大小和比率)，在很大程度上是由聚合物膜上的电荷决定的。除构成膜的材料之外，该聚合物膜电荷是由结合于其上的受体分子的电荷决定的。

5 如果受体电荷随其与特异性被分析物的亲合性反应而变化，由于在感应电极与测试流体接触之后进行的离子阶段步骤，感应电极的响应也发生变化。应当注意，由于大多数被分析物的两性性质，受体电荷取决于溶液的pH值，所以在离子阶段步骤中保持溶液的pH值恒定是非常重要的。

因此在前述方法中，基于感应电极对该感应电极与测试流体接触前后进行
10 的离子阶段过程响应的变化的测定，有可能确定与结合于感应电极的受体特异性的结合的被分析物在测试流体中的存在。在理想的情况下，膜中受体电荷的变化以及由此感应电极响应的变化直接与结合于该感应电极的受体特异性结合的被分析物在测试流体中的浓度成正比。然而，在真实的条件下，相同
15 被分析物的电荷能够显著地变化，产生不一致的定量结果。此外，亲合性反应并不总是伴随着受体电荷变化。这在测试小的或非荷电的抗原时经常发生
[14]。

总之，以前基于使用导电聚合物电极的电化学检测方法的缺点包括复杂性，感应电极制造工艺工业化受限制，所得的感应电极特性的不一致性，无性能损失存放感应电极的能力受限制。此外，前述的电化学检测规程，特别是在PCT/GB98/00548中所述方法，限制了对小分子、非荷电的分子或其等电点接近于固定在感应电极表面上受体的等电点的分子的检测。
20

本发明提供一种分析样品中被分析物的电化学分析方法，该方法很大程度上没有上述方法所固有的缺点，由于能够分析小分子和非荷电的分子，拓宽了其适用范围，提供严格的定量结果，使该电极制造工艺更适应工业生产方法，增加分析效率，改善重现性，因此提高了所得结果的可靠性。
25

因此，本发明的第一方面是提供一种用于电化学检测被分析物方法的感应电极，该感应电极包括一种涂有含衔接分子的导电聚合物的导电电极，这些衔接分子选自抗生素蛋白质、抗生蛋白链菌素、抗-FITC抗体和一种能够结合到至少一类被固定于其中的或被吸附于其上的受体分子的分子。

30 使用感应电极的电化学分析方法所固有的主要问题之一是长时间保持固定于感应电极上受体的天然性质。该领域已经实现的相关进展仅仅是有限的酶感应电极[7]。对大多数在文献[8、9、10]中使用提纯受体的电化学感应电

极，根本没有说明其有效的保存期限。保持固定化受体之天然性质在将抗体用作受体时特别关键，这可归因于它们固有的高度构型可变性。

相反，众所周知，当将抗体及其他生物分子以浓溶液形式保存时，经过长久时间仍保持其有用的性质；所以，在使用前乃至在电化学检测过程中，可能通过受体的快速固定来解决在无损工作特性的情况下延期储存感应电极的问题。

在本公开发明中，该问题是通过利用被固定在或被吸附至导电聚合物上的所谓衔接分子来解决的。衔接分子的作用是将对受检被分析物特异性的受体分子连接至感应电极的表面上。正如将在下面所讨论的那样，借助于使用衔接分子，有可能在感应电极生产中暂时分离工序。因此，下面方法是可行的，制造出含有被固定的/被吸附的衔接分子的电极，将其长时间储存，然后在电化学分析之前或者在电化学分析期间将特异性受体固定在该电极上。选择适当的衔接分子，也可能制造包含能够结合整个系列不同受体分子的衔接分子的通用感应电极。仅仅通过将适当特异性的受体结合到衔接分子上，就可在赋予“通用的”感应电极对受测被分析物的特异性。所以在电沉积过程中，不再需要引入所需的特异性的受体。

抗生素素蛋白和抗生蛋白链菌素优先选用作衔接分子。抗生素素蛋白质，一种从生鸡蛋中获得的蛋白质，是由四种同样的肽亚单位组成，其中每一种都具有一个能够与辅助因子生物素分子结合的位点。生物素（维生素H）是一种存在每种活细胞中的极微量辅酶，并被发现主要结合在蛋白质或多肽上。生物素分子进入与抗生素素蛋白质或抗生蛋白链菌素（从某些细菌温育物（例如链霉菌属aviation）中分离的一种抗生素素蛋白质）的结合反应，并在该反应期间形成事实上非解离的“生物素-抗生素素蛋白质”（络合物常数约 10^{15} mol/l ）的能力是众所周知的[11、12]。

由本公开发明的发明人进行的调查表明，被固定在导电聚合物膜中抗生素素蛋白质和抗生蛋白链菌素在延长的时间内保持其原来的天然性质（至少一年并可能更长），并在此期间一直能够用于与生物素缓合受体连接。生物素与许多不同分子缓合的技术在本领域是众所周知的。因此，仅仅通过结合适当的生物素化的受体，就能够制造出对给定的被分析物特异性的含有固定化抗生素素蛋白质或抗生蛋白链菌素的感应电极。

虽然抗生素素蛋白质和抗生蛋白链菌素是优选的衔接分子，但使用替代性衔接分子，特别是那些能够与至少一类受体分子特异性结合的分子属于在本

发明的范畴。替代性衔接分子中包括蛋白质A、蛋白质G和外源凝集素。这些分子均可结合至少一类受体分子，即表明它们能特异性结合位于一组受体分子中每个成员的共同结合位点，其结合相互作用的离解常数为小于 10^{-8} mol/l。例如，蛋白质A（一种42kD的多肽，分离于金黄色葡萄球菌或通过DNA重组技术得到）可在Fc区域结合免疫球蛋白，特别是多种哺乳动物的IgG分子；而且蛋白质G（IgG的III型Fc受体，参见Bjorck, L. 和Kronvall, G., J. Immunol., (1984) 133, 969）也可在Fc区域结合多种哺乳动物的IgG。外源凝集素是结合在糖蛋白或碳水化合物的糖部分的蛋白质。每种类型的外源凝集素对一定的糖部分具有特异性，因此将能结合多种带有恰当的糖部分的糖蛋白或复合碳水化合物。

在更进一步的实施方案中，抗-FITC抗体能被用作衔接分子。在这一实施方案中，针对被分析物的感应电极的特异性能够通过结合具有适度特异性的抗FITC抗体标记的受体而确定。

在导电聚合物膜中或其上使用衔接分子，在与感应电极接触时通过减少测试溶液中组分的非特异性的相互作用，也可显著地改进在电化学中所得分析的结果的可靠性，这与衔接分子阻滞该导电聚合物的自由表面有关。衔接分子的使用同样增加该感应电极制造工艺的技术效率，例如消除了对另外的表面阻滞过程的需要。

本发明的电势测定感应电极制造成本低，因此为了方便起见，能够以一次性使用的形式生产，意指被用来进行单个电化学检测实验或一系列检测实验，然后丢弃。本发明更进一步提供一种包括电化学检测需要的感应电极和参比电极的电极装置。如以下将讨论的那样，合适的参比电极包括银/氯化银和甘汞电极。该电极装置能够方便地作为一种一次性使用的部件提供，其包括一种装有连接感应电极和参比电极触点的、由廉价材料制造的容器或支架。

本发明的感应电极可被用于各类的电化学分析过程，包括（而不限定于）对抗原的双抗体夹层结构分析法、对抗体的双抗原夹层结构分析法、对抗原的竞争性分析法、对抗体的竞争性分析法、测定人体抗体血清的血清分析法（如使用标记的抗人类抗体的风疹IgG抗体）和IgM分析法（如IgM风疹抗体）。

因此，本发明的第二方面是提供一种用于电化学检测被分析物方法的感应电极的制备方法，该感应电极包括一种用含有衔接分子的导电聚合物涂制的导电电极，这些衔接分子选自抗生素蛋白质、抗生蛋白链菌素和一种能够

与至少一类被固定于其中的受体分子结合的分子，该方法包括下列步骤：

- (a) 制备一种含有导电聚合物单体和衔接分子的电化学聚合溶液，
- (b) 将欲涂制的电极浸入该电化学聚合溶液中，和
- (c) 在该电极和该电化学聚合溶液之间施加一种循环电势，通过该溶液

5 聚合物的电化学合成来涂制该电极，所述被施加的循环电势为至少一全循环。

本发明进一步提供一种用于样品中被分析物的电化学检测方法之感应电极的制备方法，该感应电极包括一种涂有含衔接分子的导电聚合物的导电电极，这些衔接分子选自抗生素蛋白质、抗生蛋白链菌素和一种能够与至少

10 一类被吸附于其上的受体结合的分子。该方法包括下列步骤：

- (a) 制备一种含有导电聚合物单体的电化学聚合溶液，
- (b) 将欲涂制的电极浸入在该电化学聚合溶液中，
- (c) 在该电极和该电化学聚合溶液之间施加一种循环电势，通过该溶液

15 的聚合物电化学合成涂制该电极，所述被施加的循环电势为至少一全循环；
和

- (d) 将该涂制过的电极与一种含有衔接分子的溶液接触，以使该衔接分子被吸附在该电极的导电聚合物涂层上。

按照本发明的方法，通过单体溶液的电化学合成，一种导电聚合物膜被沉积在导电的电极表面上。该导电电极优选是一种具有金属或准金属导电性，在水介质中稳定的标准电势电极。正如将在本文实施例中说明的那样，导电聚合物膜电沉积的实施是通过使用一种包含单体、极性溶剂和本底电解质的溶液中进行的。吡咯、噻吩、呋喃或苯胺为优选单体。去离子水优先作为极性溶剂使用。

如所属技术领域的专业人员众所周知的那样，为了改变该聚合物的结构和
25 /或传导性质，该导电聚合物往往在电化学合成阶段被掺杂。通常掺杂的阴离子是在聚合步骤引入硫酸根 (SO_4^{2-})，以中和该聚合物骨架上的正电荷。硫酸根不易于由离子交换释放，因此有助于保持该聚合物的结构。在本发明中，
优选使用具有与聚合物周围溶液最大离子交换容量的掺杂阴离子，以增加电极的灵敏性。当制备电化学溶液时，通过将一种其阴离子具有大离子半径的
30 盐用作本底电解质即可达到此目的。具有大离子半径的合适盐类包括十二烷基硫酸钠和葡聚糖硫酸盐。这些电化学聚合溶液中盐类的浓度按测试类型在
0.005 - 0.05 M范围内变化。

如同许多论文中报道的那样[4、5]，对于浸于溶液中的导电聚合物，与其发生离子交换的容易程度和与其达到离子平衡的快速性基本上取决于在电沉积阶段引入的抗-离子的大小：抗-离子的离子半径越大，越易于发生离子交换反应，越快达到平衡状态。这与“金属电极-导电聚合物”体系应答溶液中离子组分改变时电势变化的数值和速率直接关联[6]。

该导电聚合物膜完成双重职能，既结合感应电极表面的受体，又表示该感应电极对缓冲溶液中成分变化的敏感性。特别是影响导电聚合物氧化还原组成的缓冲溶液组成的变化导致感应电极的稳态电势发生相应的变化。

衔接分子可以通过在电化学合成阶段将衔接分子添加至电化学聚合溶液中而被固定在导电聚合物膜上，或者在电化学聚合之后被吸附在导电聚合物膜的表面。在前一种情况下，衔接分子的溶液可在沉积过程之前被迅速加到电沉积溶液中。如果配制的溶液的存储时间不超过30分钟，沉积过程运行最佳。根据测试的特定类型，在该溶液中衔接分子的浓度可在 $5.00\text{--}100.00\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围内变化。自包含衔接分子的溶液中电沉积导电聚合物的过程在本文包括的实施例中描述。在完成电沉积步骤时，所得的感应电极可用去离子水和 0.01M 磷酸盐缓冲溶液依次冲洗，根据测试的类型，可将其放置在一种包含微生物生长抑制剂或杀菌剂（如庆大霉素）的特定存储缓冲溶液中，或在室温下的无尘空气中干燥。

在完成电沉积步骤之后，可使用下列规程（虽然在此陈述该规程，但本发明决不局限于应用该特定的方法）将衔接分子吸附到膜上，首先将感应电极用去离子水冲洗，并放入新制备的 0.02M 碳酸盐缓冲液中，将它在其中保持15 - 60分钟。然后通过将感应电极浸入一个充满新制备的含有 $1.00\text{--}50.00\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度衔接分子的 0.02M 碳酸盐缓冲溶液的容器中，或通过在感应电极的表面上滴一滴该溶液，使该感应电极与该溶液相接触。该感应电极一般在 $+4^\circ\text{C}$ 与衔接分子溶液共同温育1 - 24小时。在温育之后，将该感应电极用去离子水冲洗，并在 0.01M 的磷酸盐缓冲溶液中放置1 - 4小时。根据测试的类型，该感应电极既可放置在含有微生物生长抑制剂或杀菌剂的特定存储缓冲溶液中，也可在室温下的无尘空气中干燥。

当衔接分子是抗生素蛋白质或抗生素蛋白链菌素时，本发明上述的用于生产感应电极的制备方法可任选进一步将涂制的电极与一种含有与生物素结合的特异性受体溶液接触，以使所述生物素化的受体通过生物素 / 抗生素蛋白质或生物素 / 抗生素蛋白链菌素结合相互作用结合到被固定于或被吸附至电

极的导电聚合物涂层上的抗生素素蛋白质或抗生蛋白链菌素分子上。

由本发明的作者和他人[12]进行的研究表明，在最佳条件下，与它们的非生物素化的等价物相比，生物素化的受体并不改变其性质（亲合性、存储质量等等）。

生物素与相应受体的缀合，作为本领域技术人员所熟知的生物素化的方法，可以应用已知的步骤之一进行，如[12]中所述。此外，许多制备好的特异性不同的生物素化受体有市售产品，例如由美国Calbiochem - Novabiochem 制备的抗人IgG或抗人IgA羊生物素标记的抗体。

应用生物素化受体的重要的优点之一是通过结合于感应电极上的抗生素素蛋白质或抗生蛋白链菌素与相应生物素化受体之间所产生的反应，能够改变感应电极的特异性。如前所述，与抗生素素蛋白质 / 抗生蛋白链菌素所结合的感应电极实际上是一种“通用的感应电极”，对受检目的分子的特异性是通过结合适当的生物素化受体所确定的。为了制备舍对受检被分析物有特异性的抗生素素蛋白质或抗生蛋白链菌素的感应电极，需要完成结合在感应电极上的抗生素素蛋白质或抗生蛋白链菌素与生物素化受体之间的反应，为此，感应电极与后者的溶液在室温下接触，既可将该感应电极浸入一个充满该溶液的容器中，也可将该溶液滴在感应电极表面（溶液中生物素化受体的浓度通常为0.1-100 μ g / ml；接触时间3 - 15分钟）。

这些受体分子可以是任何一种能够特异性结合另一种分子（被分析物）的分子。适当类型的受体包括单克隆和多克隆抗体、嵌和体抗体、保留能够识别抗原的抗体片段（如Fab和Fab2碎片）、重组蛋白质和其片段、合成肽、抗原、单股DNA、RNA或者PNA分子、激素、激素受体、酶、化合物等。

如上所述，在本领域已知的使用电势感应电极的电化学检测方法在检测小的和非荷电的抗原时，其用途受到限制。为了克服这个问题，并为了得到严格定量的结果，可以使用与电荷标记物缀合的次级受体或者竞争分子。

所以，本发明更进一步地提供一种检测样品中被分析物的电化学检测方法，该方法包括下列步骤：

(a) 提供一种含有导电聚合物涂层的感应电极，该涂层含有被固定于其中或者被吸附于其上的特异性结合样品中目的待测被分析物的受体；

(b) 将感应电极浸入一种含有样品的试液中，以使所述目的被分析物与所述被固定的或者被吸附的受体结合；

(c) 将该感应电极与一种含有次级受体的溶液接触，该次级受体能够与

该被分析物在空间上不同于与被固定或者被吸附的受体的结合位点的位点上结合，并且该次级受体与一种电荷标记物缀合；

(d) 当处理过的感应电极与参比电极浸入一种电解液中时，监测两者之间的电势差；和

5 (e) 在恒定pH值下，电解液的离子强度改变之后，监测感应电极与参比电极之间的电势差。

上述方法的亲合性反应步骤等价于一种本领域技术人员所众所周知的标准夹层结构分析。该夹层结构的分析程序对多价抗原的检测特别有用，在测试中所用的受体和被标记的次级受体是其结合在抗原上不同的、空间上不同的抗原决定簇的抗体。该夹层结构形式还可用于携带两个或更多同样的抗原决定簇，其在空间上是分开的抗原。在后者的情况下，受体与标记的次级受体被用于测试同样特异性的抗体。

在竞争性分析形式中完成电化学分析同样在本发明的范畴之内。所以，本发明还提供一种样品中被分析物的电化学检测方法，该方法包括下列步骤：

15 (a) 提供一种含有导电聚合物涂层的感应电极，该涂层含有被固定于其中或者被吸附于其上的能够结合样品中目的待测被分析物的受体；

(b) 将感应电极浸入一种含有样品的溶液中，以使该目的被分析物与所述被固定的或者被吸附的受体结合；

20 (c) 将感应电极与含有能够与被固定或被吸附的受体结合的竞争分子的溶液接触，该竞争分子与一种电荷标记物缀合；

(d) 当处理过的感应电极与参比电极浸入一种电解液中时，监测两者之间的电势差；并且

(e) 在恒定pH值下，电解液的离子强度改变之后，监测感应电极与参比电极之间的电势差。

25 在这一竞争性的电化学分析中，竞争分子可以是能够结合在被固定的/被吸附的受体上相同的被分析物结合部位的被标记的被分析物，或者是被标记的被分析物的结构类似物(参见图5B和图7B)。为了检测小的被分析物分子(如地高辛，如在本发明所包括的实施例中所述的)，使用被标记的被分析物作为竞争分子是特别优选的。作为一种替代方案，竞争分子可以与固定/被吸附的受体上不同的位点结合。例如，如果被固定的受体是抗体，竞争分子可以是抗免疫球蛋白的抗体(优选是Fab特异性的)或一种具有适度特异性的抗遗传型抗体(参见图5A和图7A)。

正如易于被所属技术领域的专业人员所理解的那样，参考本申请的图5A、5B、7A和7B，竞争性的检测方法通常取决于该感应电极表面上的过剩受体位点。那些不结合被分析物的受体将可用于结合竞争分子。假定受体位点的总额保持恒定，结合竞争分子的数量将与被分析物存在的数量成反比。

5 为了将与被分析物浓度有关的化学信号转换为一种可测量的电信号，与次级受体或者竞争分子缀合的电荷标记物可以是任何具有下列性质的电荷：

- (i) 在(d)部分电解液pH值下携带一种净电荷(正电或者负电)；和
- (ii) 在恒定pH值下，该电荷数量的变化相应用于该电解液离子强度的变化。

10 优选该电荷标记物带有大量电荷，即在(d)部分电解液的pH值下具有大于一个静电单位(e)的净电荷。合适的电荷标记物包括金、二茂铁和胶乳微球。电荷标记物上的电荷大小影响感应电极上导电聚合物涂层的氧化还原组分，致使步骤(d)和(e)之间的离子强度的阶段变化在感应电极和参比电极之间的电势差可以被检测到。在形成受体/被分析物/次级受体复合物(夹层结构分析法)或者受体/竞争分子复合物(竞争分析法)时，电荷标记物是唯一最接近导电聚合物的成分。由于能够测试小的和非荷电的被分析物，因此使用电荷标记物可以获得正确的定性结果，并显著扩展可测试的被分析物的范围。

20 与次级受体或者竞争分子缀合的胶乳微球体是优选的电荷标记物。与胶乳微球体的缀合可使用已知技术之一进行，例如，如[17]或者[18]所描述的那样，或者遵循由该厂家提供的规程，使用特定的用于抗体与胶乳微球体缀合的市售试剂盒，例如由Polysciences Inc., USA制造的“用于羧化珠的碳化二亚胺试剂盒”。某些制成的胶乳缀合体是由专业制造厂家市售的，如Polysciences Inc., USA。

25 作为使用电荷标记物的可替代的方案，为将与被分析物浓度有关的化学信号转换成一种可测量的电信号，还可以采用相当于上述的那些方法，使用次级受体或者竞争分子与一种酶标物缀合来完成电化学检测过程。

所以，本发明更进一步提供一种在样品中的被分析物的电化学检测方法，该方法包括下列步骤：

30 (a) 提供一种具有导电聚合物涂层的感应电极，该涂层含有被固定于其中或者被吸附于其上的能够结合在样品中目的被待测分析物的受体；

(b) 通过将该感应电极浸入一种含有样品的溶液中，以使所述的被分析

物结合到所述的被固定的或者被吸附的受体上；

(c) 将该感应电极与一种含有次级受体的溶液接触，该次级受体能够与该被分析物在空间上不同于被固定或者被吸附的受体的结合位点的位点上结合，并且该次级受体与一种酶缀合；

5 (d) 将处理过的感应电极与参比电极浸在在一种电解液之中，监测两者之间的电势差；并且

(e) 在接触一种含有所述酶作用底物的电解液后，监测该感应电极与参比电极之间的电势差。

在本发明范畴内的还有相应的竞争性的电化学检测方法，该方法包括下列
10 步骤：

(a) 提供一种含有导电聚合物涂层的感应电极，该涂层含有被固定于其中或者被吸附于其上的能够结合在样品中目的待测被分析物的受体；

(b) 通过将该感应电极浸入一种含有样品的溶液中，以使该目的被分析物结合到所述被固定的或者被吸附的受体上；

15 (c) 将感应电极与一种含有能够结合到被固定的或者被吸附的受体上的竞争分子的溶液接触，该竞争分子与一种酶缀合；

(d) 将处理过的感应电极与参比电极浸在一种电解液之中，记录两者之间的电势差；并且

20 (e) 在接触一种含有所述酶作用底物的电解液之后，记录该感应电极与参比电极之间的电势差。

在上述方法的一个实施方案中，与次级受体或者竞争分子缀合的酶能够将一种直接影响感应电极的导电聚合物涂层的氧化还原组成的底物，转换成一种对导电聚合物的氧化还原组成没有可检测作用的产物。

25 在一种可替代的实施方案中，与次级受体或者竞争分子缀合的酶能够将一种对电化学聚合物的氧化还原组成没有可检测作用的底物，转换成一种能够直接或者间接影响该导电聚合物的氧化还原组成的产物。这样一种酶的实例是辣根过氧化酶。一种酶促反应的产物可间接影响该导电聚合物的氧化还原组成的方法是造成电解液的pH值变化（因为该实施方案电解液的pH值不是缓冲的）。一种产生这类产物的酶的实例是脲酶。

30 在一种更进一步实施方案中，与次级受体或者竞争分子缀合的酶能够将一种对导电聚合物感应电极的导电聚合物涂层的氧化还原组成没有可检测作用的产物，转化成作为第二种酶的底物的产物，该第二种酶的作用是产生一种

直接或者间接影响该导电聚合物的氧化还原组成的第二种产物。

在所有的实施方案中，缀合酶通过形成受体 / 被分析物 / 次级受体络合物（夹层结构分析法）或者通过形成受体 / 竞争分子络合物（竞争形式法）进入导电聚合物的近程。

5 次级受体或者竞争分子与酶标记物的缀合可以通过本领域任何已知的技术完成（参见例如 [19]）。也可以使用不同酶标记物与不同特异性受体的缀合体的广泛市售制剂。

10 上述所有电化学检测的方法可以使用能够特异性结合至另一种分子（被分析物）的任何类型的受体完成。适当的受体类型包括单克隆和多克隆的抗体、嵌和体抗体、保持能够辨认抗原的抗体碎片（如Fab和Fab2碎片）、重组体蛋白质和其碎片、合成肽、抗原、单股DNA、RNA或者PNA分子、激素、激素受体、酶、化合物等。

15 无论次级受体还是竞争分子与电荷或酶标记物缀合，对本发明所有检测方法的最大程度的特异性和灵敏度是通过亲合性反应（即 (a) 至 (c) 步骤）以一种“顺序的”形式实现的，特别是当受检被分析物是一种多价抗原（即夹层结构分析）时。在该顺序的形式中，含结合受体的感应电极首先与含有待测被分析物存在的样品的试液接触。本文所用的术语“样品”包括此范围内所要检测被分析物存在的任何材料，包括生物学流体如全血、血清、血浆、尿、淋巴、脑脊髓液流体或者精液、环境的流体、在饮食工业使用或者生产的材料，或者上述所有的被分析物的稀释或者提取物。该样品也可以包括固体物料的溶液或者提取物。用于该试液的容器可以是一种微量滴定板的浇口窝、微离心管或者任何其它适当大小的容器。根据感应电极的几何的尺寸，试液的体积通常是5 - 200 μl 。在15 - 40°C、有或者无连续混合下，通常将感应电极和试液接触3 - 30分钟。

20 25 与试液接触后，该感应电极被转入一种装有标记的次级受体溶液的容器中。所用的容器和溶液的体积与用于感应电极和试液接触的容器和体积类似。依赖于检测所需要的灵敏度，标记的次级受体或者标记的竞争分子在溶液中的浓度通常为1 - 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在15 - 40°C、有或者无连续混合下接触3 - 30分钟。

30 作为一种“顺序的”形式可替代的方案，可以通过将感应电极与已经添加适当标记的次级受体或者标记的竞争分子的试液接触，接触时间为大约5 - 60分钟，同时完成 (b) 和 (c) 步骤，以大大减少总的测试时间和简化测试步

骤。根据其类型、特异性和检测所需要的灵敏度，加到试液中的标记的次级受体或者标记的竞争分子的浓度通常为 $1 - 100\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

为了消除使所得结果失真的在受检生物学流体和感应电极的表面之间可能的非特异性相互作用，以及标记的次级受体或者标记的竞争分子在该感应电极上的非特异性吸附，可向标记的次级受体或者标记的竞争分子的溶液中加入各种阻滞剂。合适的阻滞剂包括牛血清白蛋白（0.5% - 5%），人血清白蛋白（0.5 - 5wt.%），稀释的正常人或者动物血清（5 - 10vol%），白明胶（10 - 50 vol.%）等等。在这种情况下，标记的次级受体或者标记的竞争分子与感应电极的相互作用同时伴随有对感应电极任何自由表面的阻滞。

在本发明的全部检测方法中，可以使用包含被固定的 / 被吸附的衔接分子的感应电极。特别是受体分子可通过生物素 / 抗生物素蛋白质、生物素 / 抗生蛋白链菌素、蛋白质A / 抗体、蛋白质G / 抗体、FITC、抗-FITC或者外源凝集素 / 糖的结合相互作用附着于感应电极的表面上。

使用包含衔接分子的“通用”感应电极允许该检测方法以“一锅”的形式完成。在这一实施方案中，亲合性反应在一种使相互作用分子之间最大接触，并保证了最高灵敏度和最短的检测时间的均匀溶液中完成。在这种情况下，将受体溶液和标记的次级受体或者标记的竞争分子的溶液同时或者顺序加到在单个反应容器中含有假定包含被分析物样品的试液中。在试液中受体和标记的次级受体或者标记的竞争分子的浓度通常分别为 $0.1 - 100\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $1 - 100\mu\text{g}/\text{ml}$ 。然后将试液在 $15 - 40^\circ\text{C}$ 、有或者没有连续混合的情况下温育5 - 60分钟，以使结合反应发生。然后将包含适当衔接分子的感应电极或者通过浸入包含试液的容器或者通过在该感应电极表面上滴一滴试液使之与试液接触。在 $15 - 40^\circ\text{C}$ 下，感应电极和试液之间的接触时间通常为3 - 30分钟。然后用“离子步骤”程序，或者根据次级受体或者竞争分子是否已用电荷或者酶标物所标记，通过加入适当的酶底物，测量被分析物结合于感应电极的数量。

一旦该亲合性反应全部完成，通过将感应电极和参比电极连接到测量仪器来安装电化学电池，与电解质溶液接触（此处同样指工作溶液），在固定时间内用测量装置记录感应电极相对于参比电极的电极电势。市售的适当大小的参比电极或者为实现本发明特定目的设计的电极可用作参比。测量仪器是一种标准电势测定的测量仪或者电势稳定器。还可以使用为实现本发明目的而设计的并通过常规软件控制的PC兼容电子测量仪器。

为了方便起见，可以通过一种为连接感应电极和参比电极的装有电触点的

专用刀杆，将该感应电极和参比电极与测量仪器连接，并通过电缆或者其他设备连接到测量仪器上。还可以使用与测量仪器一体的支架，从而使该测量系统的总尺寸能够小型化。

水性缓冲液用作工作溶液：磷酸盐 - 盐水、Tris-HCl、碳酸盐、碳酸氢盐、乙酸盐、硼酸盐等等。按照感应电极的几何的尺寸，电化学电池的工作溶液的体积在50至5000 μ l之间。缓冲溶液的容器可以是具有最小吸附作用性质材料的任何合适尺寸的容器，如标准微量滴定板的浇口窝。本公开的发明的另一个实施方案是一种变体，其中一种小体积的 ($< 1\text{cm}^3$) 流通池用于与该感应电极和参比电极的整体支架连接，缓冲溶液可以通过蠕动泵或者通过其他设备泵送。

使用一种连接到电势测定的测量装置或者电压稳定器的图表记录仪，或者通过一种使用PC-兼容电子仪器的特定程序，在固定时间记录感应电极相对于参比电极的电势。在后者的情况下，该程序在预定时段测量感应电极相对于参比电极的电势（通常为每3 - 5秒，总共10 - 100秒）并以“感应电极信号-时间”为坐标点的形式显示结果。记录感应电极电势相对于参比电极电势，以测定感应电极的本底电势值 V_1 ，并评估该感应电极的本底电势漂移 (γ)，其通过对“感应电极-时间”获得的曲线使用最小二乘法的线性回归计算。

如果该次级受体或者竞争分子与一种电荷标记物缓合，在恒定pH值下，在所谓的“离子 - 步骤”程序中，通过改变电解质溶液离子强度的来评估结合至该感应电极的被分析物的量。

在该离子步骤程序中，可以通过将支架与感应电极和参比电极从初始工作溶液转移到具有相同组成只是离子强度不同的第二种工作溶液中，或者通过将不同离子强度的缓冲溶液（更高或者更低的）加到感应电极和参比电极被浸入其中的工作溶液中，改变电解质溶液的离子强度（增加或者减少）。如果使用流动池，可以通过使用一种不同离子强度的缓冲溶液排出池中初始工作溶液来改变电解质溶液的离子强度。

不同的离子强度工作溶液可以通过配制不同浓度的盐类溶液得到，例如KCl、Na₂SO₄等，其使用是根据当它们被加到溶液中时完全离解并不改变溶液pH值的事实。工作溶液中盐类的浓度为0.01 M至0.1M。

如果该次级受体或者竞争分子与一种酶缓合，则没有必要进行“离子步骤”程序。反而，工作溶液的组成通过加入一种该酶的适当底物而改变。为此，或者将支架与感应电极和参比电极一同从装有初始工作溶液的容器转移至装

有工作溶液加底物的容器中，或者将底物溶液直接加入感应电极和参比电极浸入其中的原始工作溶液中。如果使用流动池，工作溶液的组成可以通过用一种包含底物的工作溶液排出池中初始工作溶液来改变。

可以使用的底物包括ABTS（{2, 2'-偶氮基-双[3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸]}）、TMB（3, 3', 5, 5'-四乙基联苯胺）、DAB（3, 3'-二氨基联苯胺）（其中的酶标记物是过氧化酶）、尿素（其中的酶标记物是脲酶）、p-NPP（磷酸对-硝基苯酯）、BCIP（5-溴代-4-氯代-3-吲哚磷酸酯）（其中的酶标记物是碱性磷酸酶）。

使用一种测量仪器，在固定时间段记录该感应电极电势相对于参比电极电势响应于工作溶液的离子强度阶段变化或添加酶底物的变化。此外，使用一种连接到电势测定的测量装置或者电压稳定器的图表记录仪，或者通过使用PC-兼容电子仪器的特定程序来进行记录。在后者的情况下，该程序在预定时段测量感应电极电势相对于参比电极电势（通常为每3 - 5秒）并以“感应电极信号-时间”为坐标的点的形式显示结果。依检测的具体类型，用于记录感应电极相于参比电极的电势变化的时间间隔在30到600秒之间变化。

在其中缓冲溶液的离子强度被改变的情况下，感应电极电势相对于参比电极电势的变化所得的曲线通常为抛物线的形式，并表示感应电极对缓冲溶液在离子强度方面变化的响应，其通过导电聚合物膜的电荷总数（等电点）来调节。

如果该分析是作为夹层结构分析进行的，聚合物膜的总电荷变化与受检被分析物的数量成正比。然而，如果该分析是作为竞争分析进行的，聚合物膜的总电荷变化通常与受检被分析物的数量成反比。

在完成这一程序阶段时，测定感应电极电势相对于参比电极电势的最终电势 V_2 。因此可以计算感应电极电势相对于参比电极电势变化的下列定量特性：

1. 感应电极电势相对于参比电极电势变化所得曲线的（积分）面积 S_2 ：

$$S_2 = \int_{T_1}^{T_2} f_2(t) dt$$

其中： $T_2 - T_1$ = 记录本底电势漂移或者相对于参比电极电势的总时间周期； f_2 = “以毫伏计的感应电极电势-时间”的曲线； t = 当前记录时间；和

2. 该感应电极基础与最后的电势之间以毫伏计的差值：

$$\delta = V_2 - V_1$$

基于感应电极电势响应于在工作溶液的离子强度或者组成方面的变化而变化的数量特征，可测定在试液中目标被分析物的定量含量。

使用上述所得的 γ 、 S_2 和 / 或 δ ，将基线漂移计算在内，再计算这些数值，得到 S_2' 和 / 或 δ' ，以此为基础，测定目标被分析物在试液中的量。该校正值 S_2' 和 δ' 可与“分析结果对目标被分析物量”校准曲线相比。正如将对所属技术领域的专业人员而言是易于显而易见的，用于绘制校准曲线的数据可以类似于如上所述的方式，使用一定范围的包含已知量的目标被分析物的试液得到。

本发明更进一步提供一种电化学检测样品中的被分析物的方法，该方法包括下列步骤：

(a) 提供一种包括涂有含被固定其中或者被吸附其上的抗生素蛋白质或者抗生蛋白链菌素的导电聚合物的导电电极的感应电极，经由生物素 / 抗生素蛋白质或者生物素 / 抗生蛋白链菌素结合相互作用，该抗生素蛋白质或者抗生蛋白链菌素分子被附着在能够结合待测被分析物的受体分子上；

(b) 将感应电极与含有样品的试液接触，以使该被分析物结合至所述被固定的或者被吸附的受体分子上；

(c) 将该感应电极与参比电极浸在电解液之中，记录两者之间相对的电势差；和

(d) 在恒定 pH 值下，电解液的离子强度或者组成改变之后，监测感应电极相对于参比电极的电势差。

这种电化学检测方法用于目标被分析物结合到受体上造成感应电极表面足以被测量的电荷变化，而不需要单独的电荷或者酶标记物。特别是，本方法可用于核酸的电化学检测。目标核酸结合到附着于电极表面的核酸探针（如低聚核苷酸）上伴随有足够的电荷变化，可通过“离子-步骤”程序检测。因此不需要使用与电荷标记物缀合的次级受体或者竞争分子。在进行检测过程之前，疑有包含特异性核酸的材料（如生物学流体）可通常经历一种放大步骤（如 PCR）。因此对经历了放大步骤的特异性核酸样品进行电化学检测是在本发明的范畴之内的。

参考下列非限定实施例与描绘其主要实施阶段的附图，本发明将得到更进一步理解。

图 1A：图示说明由电势电极组成的感应电极 (1)，该电极上涂有导电聚

合物层(2), 抗生素蛋白质或者抗生蛋白链菌素分子(3)被固定在该聚合物层中。

图1B: 图示说明由电势电极组成的感应电极(1), 该电极上涂有导电聚合物层(2), 抗生素蛋白质或者抗生蛋白链菌素分子(3)被吸附在该聚合物层表面上。
5

图2A: 通过被固定在聚合物层的抗生素蛋白质或者抗生蛋白链菌素和与生物素(5)缀合的抗体(4)之间的结合反应, 说明感应电极特异性结合被分析物(假定为抗原、介质或高分子量物质)的过程。

图2B: 通过被固定在聚合物层中的抗生素蛋白质或者抗生蛋白链菌素和与生物素(5)缀合的抗原(6)之间的结合反应, 说明测试过程中感应电极特异性结合被分析物(假定为抗体)的过程。
10

图2C: 通过被固定在聚合物层中的抗生素蛋白质或者抗生蛋白链菌素和与生物素(5)缀合的DNA探针(7)之间的结合反应, 说明测试过程中感应电极特异性结合被分析物(假定为DNA分子)的过程。
15

图3A: 表明感应电极与包含对被固定在该感应电极上的生物素化抗体特异性的抗原(6)的试液接触的过程。

图3B: 表明感应电极与包含对被固定在该感应电极上的生物素化抗原特异性的抗体(4)的试液接触的过程。

图3C: 表明感应电极与包含对被固定在该感应电极上的生物素化DNA探针特异性的DNA分子(8)的试液接触的过程。
20

图4A: 表明感应电极与和电荷标记物(10)缀合并对待测抗原特异性的次级受体(9)的溶液接触的过程(血清的分析方式, 其中如自身抗体是通过利用与电荷标记物缀合的抗异型抗体测定的)。

图4B: 表明感应电极与和电荷标记物(10)缀合并对待测抗体特异性的次级受体(11)的溶液接触的过程(夹层结构分析方式, 在次级受体是抗异型抗体的情况下)。
25

图5A: 表明感应电极与和电荷标记物(10)缀合并对生物素化的抗体特异性的竞争分子(12)的溶液接触的过程(竞争分析方式)。

图5B: 表明感应电极与和电荷标记物(10)缀合并对生物素化的抗原特异性的竞争分子(13)的溶液接触的过程(竞争分析方式)。
30

图6A: 表明感应电极与和一种酶(14)缀合并对受检抗原特异性的次级受体(9)的溶液接触的过程(夹层结构分析方式)。

图6B：表明感应电极与和一种酶（14）缓合并对受检抗体特异性的次级受体（11）的溶液接触的过程（血清的分析方式，其中如自身抗体是通过利用与一种酶缓合的抗异型抗体测定的）。

5 图7A：表明感应电极与和一种酶（14）缓合并对生物素化的抗体特异性的竞争分子（12）的溶液接触的过程（竞争分析方式）。

图7B：表明感应电极与和一种酶（14）缓合并对生物素化的抗原特异性的竞争分子（13）的溶液接触的过程（竞争分析方式）。

10 图8A：举例说明一种感应电极以“顺序的”的形式与[图8A1]生物素化受体、[图8A2]试液、[图8A3]标记的次级受体溶液顺序接触，并随后测量感应电极电势相对于参比电极电势[图8A4]的电化学分析步骤。

图8B：举例说明电化学分析步骤，其中首先将感应电极浸入生物素化的受体溶液中[图8B1]，然后将感应电极浸入加有适当标记的次级受体的测试液中[图8B2]，测量感应电极电势相对于参比电极电势[图8B3]。

15 图8C：举例说明在“一锅”形式中的电化学分析步骤，其中将生物素化的受体和标记的次级受体加到试液中[图8C1]，然后将感应电极放入与该试液接触[图8C2]，并随后测量感应电极电势相对于参比电极电势[图8C3]。

20 图9：举例说明在工作溶液的离子强度或者组成阶梯式的变化时，感应电极电势变化曲线的典型形状（以“毫伏-时间”双坐标），随后将感应电极与不含任何被分析物的试液温育（曲线2），以及随后将感应电极与包含对生物素化的受体特异性被分析物的试液温育（曲线2）。

图10：表明所测得的感应电极相对于参比电极的本底电势与最后电势的电势差以毫伏计相对于血清样品中HBsAg浓度的校准曲线。

图11：表明所测得的感应电极相对于参比电极的本底电势与最后电势的电势差以毫伏计相对于HbsAg-阳性血清稀释液的电势差曲线。

25 在实施例中所用的试剂、材料和设备见如下：

试剂和材料：

吡咯(>98%)购自Merck公司，使用前使用真空蒸馏法提纯两次，然后在氮气下在不透明的容器中在+4℃下存放；

下列试剂全部购自美国Sigma Chemical公司：

30 氢氧化钾(KOH, ACS试剂)、氢氧化钠(NaOH, ACS试剂)、叠氮化钠(SigmaUltra)、硫酸高铈(ACS试剂)、氯化钾(SigmaUltra)、氯化钠(SigmaUltra)、三[羟甲基]氨基甲烷(SigmaUltra)、十二烷基硫酸钠(SDS,

>99%)、葡聚糖硫酸钠(分子量约8000)、异丙醇(ACS试剂)、丙酮、盐酸(ACS试剂)、氯酸(ACS试剂)、N,N-二甲基甲酰胺(ACS试剂)、甘氨酸缓冲溶液(0.2M)、“三盐缓冲片”、“磷酸盐缓冲片”、“邻苯二胺二氯化物片”、牛血清白蛋白(RIA等级, 级分V)、冰冻牛血清、抗生蛋白链菌素(来自链霉菌属avidinii), NHS-d-生物素, 二甲基亚砜(DMSO、ACS试剂)、生物素-X-X-NHS、牛白蛋白的兔多克隆抗体、小鼠IgG的羊多克隆抗体与脲酶的缀合物、地高新、小鼠单克隆抗-地高新克隆DI-22生物素复合物、过氧化酶(每一毫克固体100单位)、一次性的透渗析袋(MWCO 1,000); 除非另有说明, 磷酸盐缓冲溶液(PBS)一直在pH值7.4使用。

乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的小鼠单克隆抗体(5.7 mg/ml含0.01%叠氮化钠的磷酸盐缓冲溶液), 小鼠IgG的羊多克隆抗体(10.0毫克/ml含0.01%叠氮化钠的磷酸盐缓冲溶液)和HBsAg的小鼠单克隆抗体与过氧化酶的缀合物(2.5毫克/ml含0.01%叠氮化钠的磷酸盐缓冲溶液)购买自Sorbent-Service Ltd. (俄国);

冷冻胰岛素(牛的, 约20IU/mg)和胰岛素的小鼠单克隆抗体(1.2 mg/ml磷酸盐缓冲溶液), 由附属于俄国医药科学院的心脏病学研究中心会员惠赠;

冷冻的双股DNA-探针制剂(长度约1kb)通过缺口移位生物素化[20], 与生物素化DNA探针互补的冷冻双股DNA制剂、与生物素化DNA探针非互补的冷冻双股DNA制剂、来自鲑鱼精液的冷冻DNA制剂和用于DNA杂化反应的缓冲溶液, 都由附属于卫生部的科学研究院成员惠赠。

Polybead[®]硫酸盐微球体(2.5%固体-胶乳, 0.2 μm), 购买自Polysciences Inc公司;

LavsanTM薄膜(约500 μm厚), 购买自Vladimir化工厂(俄国);

分散在真空和光致抗蚀剂中的铬靶《FP - 383》, 购买自NIIPIK研究所(俄国);

去离子水(试剂等级, 电阻>18Ω)使用Millipore Milli -R0 / Milli -Q系统得到;

铂丝, 厚度约0.5 mm;

有关英国第二工作标准的乙型肝炎表面抗原(HBsAg浓度0.50 iU/ml), 由英国北方伦敦输血中心惠赠;

HBsAg阳性的人类血清样品, 由北方伦敦输血中心惠赠;

设备:

UVN真空沉积装置（俄国）；
《PNP - 6Ts》光致抗蚀应用装置（俄国）；
自制光-模板（在WO 96/02001的图1、图3或者图4中所示的其给予电极设计的光-模板是适用的）；
5 《STP - 300》曝光装置（俄国）；
自制的索格利特抽提器；
EU 18干热柜（Jouan, 法国）；
《PI - 50.1》带标准积分器和双坐标记录器的电压稳定器-恒流器（俄国）；
10 双道记录器2210（LKB - Pribori, 瑞典）；
带标准复合电极的Checkmate pH计（Mettler, 瑞士）；
自制Ag/AgCl半-微参比电极，直径约2.5 mm，充满饱和的KCl溶液；
AgCl参比电极N°476370（Corning）；
针对用途设计的PC兼容测量仪器，包括放大器和模拟-数字转换器，由常
15 规软件控制；
针对用途设计的感应电极和参比电极支架。

实施例1

HBsAg测定；竞争性分析；样品-稀释性样本；受体-生物素化的单克隆小
鼠抗-HBsAg；竞争分子-标记的羊多克隆抗小鼠免疫球蛋白G；电荷标记
20 物-胶乳。

1. 1. 电极基材由60 x 48mm Lavsan薄膜制备，然后在热异丙醇中洗涤并在异丙醇蒸汽中干燥。0.05 μm铬层通过磁控管沉淀涂敷到该基材上。通过离心作用将光致抗蚀剂涂敷在铬层上并在+80℃下干燥20分钟。将该光致抗蚀剂层用紫外光通过图形光模板曝光。将该光致抗蚀剂层在KOH溶液中显影，然后25 +100℃下干燥20分钟。该铬图形通过在硫酸高铈溶液中刻蚀得到。使用二甲基酰胺将光致抗蚀剂除去，然后冲洗并在热异丙醇蒸汽中干燥。通过在氯化金溶液的电沉积，将0.50 μm黄金层涂敷于铬图形上，随后冲洗并在异丙醇蒸汽中干燥。

1. 2. 将如此得到的电极在2-5% KOH溶液中洗涤两次30分钟，用去离子水30 冲洗并在丙酮中洗涤两次5分钟，然后在室温下风干20分钟。将电极插在氟塑料支架上，并放入索氏抽提器中，在热异丙醇中洗涤0.5 - 2小时。然后将支架与电极一同从索氏抽提器中移开，并在异丙醇蒸汽中干燥。以上过程完成

后，将电极置于密封的玻璃容器中。

1.3. 用于感应电极的存储溶液是通过将8.0克氯化钠、12.2克三(羟甲基氨基甲烷)、0.2克氯化钾和0.1克叠氮化钠溶解在1升去离子水配制的。

1.4. HBsAg的小鼠单克隆抗体按如下生物素化：

5 包含叠氮化钠的0.01M三盐缓冲溶液(pH值8.0)，是通过将20片三盐缓冲片和0.15g叠氮化钠溶解在1.50升去离子水中制备的；

将1.0 mg的NHS-d-生物素溶于1ml的DMSO中；

将176 μ l购买的HBsAg的小鼠单克隆抗体(5.7mg/ml)加至一个包含824 μ 10 1.01M磷酸盐缓冲溶液的微管中；

将50 μ l的NHS-d-生物素的DMSO溶液加至所得的溶液中；

将包含该混合物的微管放置在热混合器中并在+22℃温度下连续混合4小时；

然后将该混合物置于含叠氮化钠且体积500倍过量的0.01M三盐的缓冲溶液中，在+4℃下透析过夜；

15 将该生物素化抗体的产物溶液等分成多个小包装(约10 μ l)并在+4℃储存。

1.5. 小鼠IgG的羊多克隆抗体与胶乳微球按如下方法缀合：

含叠氮化钠的甘氨酸缓冲液(pH值8.2)：将500ml 0.2M甘氨酸缓冲溶液加到500ml去离子水中，加入8.5g氯化钠和0.1g叠氮化钠，并用0.1M NaOH溶液将pH值调至8.2；

将60 μ l购买的小鼠IgG的羊多克隆抗体(10mg/ml)加到包含940 μ l甘氨酸缓冲盐水溶液的微管中(优选该多克隆抗体在标记之前进行亲合性纯化)；

将200 μ l 2.5% Polybead®硫酸盐微球悬浮液加到所得溶液中；

将包含该混合物的微管放置在热混合器中并在37±1℃温度下连续混合30分钟；

然后将包含该混合物的微管冷却至室温，并加入0.01g牛血清白蛋白；

将所得标记的抗体溶液等分成多个小包装(约5 μ l)并在+4℃储存。

1.6. 在聚合之前，将单体(如吡咯)在标准水冷式的仪器中在大气压力、135-140℃下蒸馏，并在N₂气氛、-20至-5℃下保存在一种密封的不透明容器中。根据测试的类型，单体在电化学聚合溶液中的浓度在0.3-1.0 M的范围内变化。

在该实施例中用于吡咯电化学聚合的溶液按如下制备：

将2.5ml新近蒸馏的吡咯和0.02g的SDS溶于20.0ml的去离子水中；

将磷酸盐缓冲片溶于200ml的去离子水中，4.0mg的抗生蛋白链菌素溶于2ml的PBS中；

将1ml抗生蛋白链菌素的PBS溶液加到吡咯和SDS的溶液中；

将最后的溶液放入轨道式混合器中，并混合10分钟。

1.7. 电沉积步骤在一种三电极电化学电池中进行，该三电极包括工作电极、参比电极和辅助（计数器）电极。工作电极是如上所述制备的金属电势电极，辅助电极是一段金或者铂丝，参比电极是银/氯化银电极。

使用电压稳定器，在工作电极上连续施加电压扫描进行沉积。根据所需聚合物膜的厚度和性质，改变较低电势的扫描边界、较高电势的扫描边界、电压扫描速率和扫描循环数目，它们通常分别为-500mV至+800mV，+1000mV至+2000mV（相对于Ag/AgCl参比电极）、25-200 mV / 秒与3 - 30。

在该实施例中聚吡咯膜由电化学沉积形成，抗生蛋白链菌素结合在该电极上，步骤如下：

15 将200 μ l电化学聚合溶液放入微量滴定板的浇口窝中；

将连接电压稳定器上的电极、铂丝和半微参比电极浸入该浇口窝中；

相对于参比电极的电极电势在+800至+1800mV范围内进行循环扫描，电压扫描速率150mV / 秒；

20 形成聚吡咯膜的过程用一种连接电压稳定器的相应输出的双坐标图表记录仪，参考伏安曲线，并使用一种连接电压稳定器的相应输出的积分仪和图表记录仪，参考经过电极的总电量进行监测。对该沉积的整个过程进行检查，以保证第一次经过工作电极的电量和后来的循环相差不超过15%；

当聚吡咯膜达到规定厚度时（电势扫描循环数约为8，通过电极的总电量为约750 mC），该过程停止。

25 1.8. 将涂有含结合抗生蛋白链菌素的聚吡咯膜的感应电极从浇口窝处移走，用去离子水冲洗，随后用0.01M磷酸盐缓冲溶液（pH值7.4）冲洗，并放入含300 μ l存储溶液的微管中，在+4°C下储存。

1.9. 重复步骤1.7 - 1.8，以得到需要数量的感应电极。

1.10. 用预先解冻的牛血清稀释英国第二应用标准的乙型肝炎表面抗原，稀释倍数为2、4、8和10，向装有100、50、25和20 μ l英国第二应用标准的乙型肝炎表面抗原的不同的微管中，分别加入100、150、175和180 μ l牛血清，制备一系列200 μ l已知HBsAg浓度的样品。纯牛血清用作不含HBsAg的样

品。

1.11. 将0.2mlHBsAg之生物素化的小鼠单克隆抗体的合适滴定量的溶液加到19.8ml的0.01M磷酸盐缓冲溶液中。在一种轨道式摇动器中完全混合，然后以每份200 μ l等分至微管中。

5 1.12. 将0.1ml（胶乳缀合）标记的小鼠IgG之羊多克隆抗体的合适滴定量的溶液加到19.9ml的0.01M磷酸盐缓冲溶液中，在一种轨道式混合器中完全混合，然后以每份200 μ l等分至微管中。

1.13. 工作缓冲溶液N°1配制如下：

将磷酸盐缓冲片溶解于200ml的去离子水中；

10 将2g牛血清白蛋白和0.37g KC1溶于所得的溶液中。

1.14. 通过在200ml的去离子水中溶解磷酸盐缓冲片配制N°2工作缓冲溶液。

15 1.15. 将适当数量的涂有含结合抗生蛋白链菌素的聚吡咯膜的感应电极从存储缓冲溶液中移开，并将每个电极放入包含生物素化的HBsAg之小鼠单克隆抗体溶液（来自步骤1.11）的微管中，在室温下温育10分钟。

1.16. 当完成1.15时，将感应电极从包含生物素化抗体溶液的微管中移开，并将每个电极放入一个包含已知的HBsAg浓度样品（来自1.10）的微管中，然后将带感应电极的微管放入热混合器中并在37±1°C下不断混合15分钟。

20 1.17. 当完成1.16时，将感应电极从包含样品的微管中移开，并放入包含胶乳缀合的小鼠IgG之羊多克隆抗体的微管中（来自1.12），然后放入旋转摇动器中并在室温下连续混合5分钟。

25 1.18. 当完成1.17时，将感应电极从微管移开，在0.01M磷酸盐缓冲溶液中冲洗3 - 5秒，并将每个电极放入充满工作缓冲溶液N°1的微量滴定板的浇口窝中。

1.19. 将感应电极和参比电极连接到与PC控制的测量装置相连的支架的电触点上，并将该支架固定在充满N°1工作缓冲溶液微量滴定板浇口窝的上方。

30 1.20. 启动常规软件，并用来记录30秒的时间感应电极电势相对于参比电极电势的毫伏数。

1.21. 完成1.20后，以类似于在1.19所述的方式，将该支架固定在充满N°2工作缓冲溶液的微量滴定板浇口窝之上。

1.22. 启动常规软件，并用来记录100秒的时间感应电极电势相对于参比电极电势变化的毫伏数。

1.23. 使用常规软件，计算该感应电极的本底电势和最后电势之差 δ 的毫伏数。

5 1.24. 使用在1.10过程中制备的已知浓度的HBsAg样品，顺序重复在1.19 - 1.21中所述的操作。

1.25. 将在1.24步骤所得的结果，用常规软件绘制“ δ 对样品中HBsAg的浓度”曲线（图10），并根据该曲线测定该感应电极系统绝对灵敏度的下限。

实施例2

10 HBsAg测定；竞争性分析；样品-稀释性样本；受体-生物素化单克隆小鼠抗HBsAg；竞争分子-标记的羊多克隆抗小鼠免疫球蛋白G；电荷标记物-胶乳。

2.1. 进行在1.1 - 1.5中所述的过程。

2.2. 用于吡咯电化学聚合的溶液按如下制备：

15 将2.5ml新蒸馏的吡咯和0.05g的SDS溶于20.0ml去离子水中。

2.3. 聚吡咯膜按如下方法由电化学沉积形成：

将200 μ l的电化学聚合溶液放入微量滴定板的浇口窝中；将连接到电压稳定器上的电极、铂丝和半微参比电极浸入该浇口窝中；

20 相对于参比电极的电极电势的循环扫描在+800至+2200mV范围内，扫描速率100mV/秒；

参照用连接到电压稳定器相应输出的X-Y图表记录仪记录的伏-安曲线，和用连接到电压稳定器的相应输出的积分器和图表记录仪记录的通过电极的总电量，监测聚吡咯膜形成的过程；

25 当聚吡咯膜达到规定厚度时（电势扫描循环数6；通过该电极的总电量约为750 mC），停止该过程。

2.4. 将涂有聚吡咯膜的感应电极从浇口窝处移走，用去离子水冲洗，随后用0.01M磷酸盐缓冲溶液（pH值7.4）冲洗，并放入含300 μ l存储溶液的微管中，在+4℃下储存。

2.5. 重复在2.1 - 2.4中所述的过程，以得到需要数量的感应电极。

30 2.6. 将磷酸盐缓冲片溶解在200ml的去离子水中，并用所得溶液溶解1.0 mg抗生蛋白链菌素，配制抗生蛋白链菌素溶液。

2.7. 按如下步骤将抗生蛋白链菌素结合至覆在感应电极的聚吡咯膜的

表面上：

将抗生蛋白链菌素溶液等分至 $200\mu\text{l}$ 并置于微管中；

将涂有聚吡咯膜的感应电极从存储缓冲溶液中移开，将每个电极放入带抗生蛋白链菌素溶液的微管中，并在 $+4^\circ\text{C}$ 下温育18小时；

5 将感应电极从包含抗生蛋白链菌素溶液的微管中移出，用 0.01M 的磷酸盐缓冲溶液洗涤，并将每个电极放入存储缓冲溶液中，然后在 $+4^\circ\text{C}$ 下储存。

2.8. 一系列已知浓度的HBsAg样品如1.10中所述制备。

2.9. 将 0.1ml 合适滴定量的生物素化HBsAg之小鼠单克隆抗体溶液加到 19.9ml 的 0.01M 磷酸盐缓冲溶液中。在旋转摇动器中完全混合，然后以 $200\mu\text{l}$ 等分至微管中。

10 2.10. 将 0.1ml 合适滴定量的标记（缀合胶乳）小鼠IgG之羊多克隆抗体的溶液加到 19.9ml 的 0.01M 磷酸盐缓冲溶液中，在轨道式混合器中完全混合，然后以 $200\mu\text{l}$ 等分至微管中。

2.11. 工作缓冲溶液N°1如1.13中的描述配制。

15 2.12. 工作缓冲溶液N°2如1.14中的描述配制。

2.13. 将涂有含结合抗生蛋白链菌素的聚吡咯膜的感应电极从存储缓冲溶液中移出，并将每个电极放入包含生物素化的HBsAg之小鼠单克隆抗体溶液的微管中，并在室温下温育10分钟。

20 2.14. 当完成2.13时，将感应电极从包含生物素化抗体溶液的微管中移开。并将每个电极放入包含已知的HBsAg浓度样品的微管中（来自步骤2.8），然后将带感应电极的微管放入热混合器中并在 $37\pm1^\circ\text{C}$ 下连续混合15分钟。

25 2.15. 当完成2.14时，将感应电极从包含样品的微管中移出，并放入包含胶乳缀合小鼠IgG之羊多克隆抗体的微管中（来自步骤2.10），然后放入旋转的摇动器中，并在室温下连续混合5分钟。

2.16. 当完成2.15时，将感应电极从微管移出，在 0.01M 磷酸盐缓冲溶液中冲洗3 - 5秒，并将每个电极放入充满工作缓冲溶液N°1的微量滴定板的浇口窝中。

30 2.17. 将感应电极和参比电极连接到与PC控制的测量仪器相连的支架的电触点上，并将该支架固定在装有N°1工作缓冲溶液微量滴定板浇口窝的上方，以使该感应电极和参比电极浸入该溶液中。

2.18. 启动该常规软件，并用来记录30秒的时间感应电极电势相对于

参比电极电势的毫伏数。

2.19. 完成2.18后，以类似于在2.17中所述的方式，将该支架定位在充满N^o2工作缓冲溶液的微量滴定板浇口窝之上。

2.20. 该常规软件用来记录100秒的时间感应电极电势相对于参比电
5 极电势变化的毫伏数。

2.21. 使用该常规软件，计算该感应电极的本底电势和最后电势之差
(δ) 的毫伏数。

2.22. 使用在2.8步骤中制备的已知浓度的HBsAg样品，顺序重复在
2.17 - 2.20中所述的操作。

10 2.23. 将步骤2.22所得的结果，使用该常规软件绘制“ δ 对样品中HBsAg
浓度”的校准曲线。

2.24. 将若干HBsAg-阳性的血清样品（包含一种未知浓度的HBsAg）在
预先解冻的牛血清中分别连续稀释，以制备一系列稀释倍数为10、100、1000、
5000和10000的样品。将分成200 μ l等分的每种稀释液放入分开的微管中。

15 2.25. 使用在2.13 - 2.21中所述的步骤测定每一稀释液的HBsAg浓
度，使用这些结果和在步骤2.23中所得的校准曲线，计算在血清样品中初始
的（未稀释的）HBsAg浓度（图11）。

实施例3

20 抗白蛋白抗体测定；竞争性分析法；样品-白蛋白的兔多克隆抗体；受体
-生物素化的牛血清白蛋白；竞争分子-标记的白蛋白之兔多克隆抗体；电荷
标记物-胶乳。

3.1. 进行在1.1 - 1.3中所述的过程。

3.2. 牛血清白蛋白（BSA）按1.4. 中所述进行生物素化。将所得生物素
化的BSA溶液等分成小包装（约10 μ l）并在+4℃储存。

25 3.3. 按1.5中所述的步骤，使牛白蛋白的兔多克隆抗体与胶乳微球体缓
合。将所得的标记抗体溶液等分成小包装（约5 μ l），并在+4℃储存。

3.4. 如2.2. 中所述配制吡咯的电化学聚合溶液。

3.5. 如在2.3中所述电化学沉积形成聚吡咯膜。

30 3.6. 将涂有聚吡咯膜的感应电极从浇口窝处移走，用去离子水冲洗，随
后用0.01M磷酸盐缓冲溶液（pH值 7.4）冲洗，并放入含300 μ l存储溶液的微
管中，在+4℃下储存。

3.7. 重复在3.1 - 3.6中所述的过程，得到需要数量的感应电极。

3.8. 抗生蛋白链菌素的溶液如2.6中所述配制。

3.9. 如2.7中所述，抗生蛋白链菌素被结合于覆盖感应电极的聚吡咯膜的表面上。

3.10. 一系列已知的浓度的未标记的牛白蛋白之兔多克隆的抗体制备
5 如下：

购买的牛白蛋白之兔多克隆抗体在500倍过量的0.01M磷酸盐缓冲溶液中
在+4℃下透析过夜；

将所得牛白蛋白之兔多克隆抗体的0.01M磷酸盐缓冲溶液顺序用0.01M磷
酸盐缓冲溶液以10、20、50、100、1000和5000的稀释倍数稀释；

10 将每一稀释样品的200μl等分溶液分别放入微管中。

3.11. 将0.8ml生物素化BSA的适当稀释溶液加到19.2ml的0.01M磷
酸盐缓冲溶液中，在旋转摇动器中完全混合，将每一稀释样品的200μl等分溶液
分别放入微管中。

3.12. 将0.1ml合适滴定量的标记（胶乳缀合的，如上所述）的牛白蛋
15 白之兔多克隆抗体的溶液加到19.9ml的0.01M磷酸盐缓冲溶液中，在轨道式混
合器中完全混合，然后以200μl等分至微管中。

3.13. 工作缓冲溶液N°1配制如下：

将一磷酸盐缓冲片溶解于200ml的去离子水中；

将0.37gKC1溶于所得溶液中。

20 3.14. 工作缓冲溶液N°2如1.14中所述配制。

3.15. 将涂有含结合抗生蛋白链菌素的聚吡咯膜的感应电极从存储缓
冲溶液中移开，并将每个电极放入一个含有200μl生物素化BSA的溶液（来自
步骤3.11）的微管中，并在室温下温育25分钟。

25 3.16. 当完成3.15时，将感应电极从包含生物素化BSA的溶液的微管中
移开，并将每个电极放入一个包含已知浓度的未标记的牛白蛋白之兔多克隆
抗体样品的微管中，然后将带感应电极的微管放入热混合器中，并在37±1℃
下连续混合25分钟。

30 3.17. 当完成3.16时，将感应电极从包含样品的微管中移开，并转入
包含胶乳缀合的牛白蛋白之兔多克隆抗体（来自步骤3.12）的微管中，然后
放入旋转摇动器中，并在室温下连续混合10分钟。

3.18. 当完成3.17时，将感应电极从微管中移开，在0.01M磷酸盐缓冲
溶液中冲洗3 - 5秒，并将每个电极放入装有工作缓冲溶液N°1微量滴定板的

浇口窝。

3.19. 将感应电极和参比电极连接到与基于PC的测量仪器相连支架的电触点上，并将该支架定位在充满N°1工作缓冲溶液微量滴定板浇口窝的上方，以使感应电极和参比电极浸入该溶液中。

5 3.20. 启动常规软件用来记录100秒的时间感应电极电势相对于参比电极电势的毫伏数。

3.21. 当完成3.20时，以类似于在3.19所述的方式，将该支架定位在充满N°2工作缓冲溶液的微量滴定板浇口窝之上。

10 3.22. 启动该常规软件用来记录200秒的时间感应电极电势相对于参比电极电势变化的毫伏数。

3.23. 使用该常规软件，通过感应电极电势变化对参比电极电势的所述曲线，计算（积分）面积S2。

3.24. 用在3.10过程中用已知浓度的未标记的牛白蛋白之兔多克隆抗体制备的样品，顺序重复在3.19 - 3.23中所述的操作。

15 3.25. 基于步骤3.24所得的结果，使用常规软件绘制“S₂对样品中未标记的牛白蛋白之兔多克隆抗体的浓度”的校准曲线。

实施例4

HBsAg测定；夹层结构分析法；样品-已知HBsAg浓度的样品；受体-生物素化的HBsAg之小鼠单克隆抗体；标记的HBsAg之小鼠单克隆抗体；标记物-过氧化酶。

4.1. 进行在1.1 - 1.4中所述的过程。

4.2. 用于吡咯电化学聚合的溶液如2.2中所述制备。

4.3. 聚吡咯膜如在2.3中所述由电化学沉积形成。

25 4.4. 将涂有聚吡咯膜的感应电极从浇口窝处移走，用去离子水冲洗，随后用0.01M磷酸盐缓冲溶液（pH值7.4）冲洗，并放入含300μl存储溶液的微管中，将其在+4°C下储存。

4.5. 重复在4.1 - 4.4中所述的过程，得到需要数量的感应电极。

4.6. 抗生蛋白链菌素的溶液如2.6中所述配制。

30 4.7. 如2.7中所述，将抗生蛋白链菌素结合于覆在该感应电极的聚吡咯膜的表面上。

4.8. 一系列已知HBsAg浓度的样品如1.10中所述制备。

4.9. 将0.2ml合适滴定量的生物素化的HBsAg之小鼠单克隆抗体的溶液

加到19.8ml的0.01M磷酸盐缓冲溶液中，在一种旋转摇动器中完全混合，然后以200 μ l等分至微管中。

4.10. 将5ml预先解冻的牛血清加到15ml的0.01M磷酸盐缓冲溶液中，0.4ml合适滴定量的购买的过氧化酶-HBsAg之小鼠单克隆抗体的溶液加到5 19.6ml的产物溶液中，将其在旋转摇动器中完全混合，并以200 μ l等分至微管中。

4.11. 通过在200ml的去离子水中溶解磷酸盐缓冲片配制N°1工作缓冲溶液。

4.12. 工作缓冲溶液N°2配制如下：

10 将一片邻-苯二胺二氯化物片和一片尿素过氧化氢/缓冲片溶于20ml的去离子水中；

将0.1ml所得的溶液加至19.9ml的0.01M磷酸盐缓冲溶液中，在旋转摇动器中完全混合，放入不透明玻璃容器中在+4℃下储存，直到开始测试。

15 4.13. 将涂有含结合抗生蛋白链菌素的聚吡咯膜的感应电极从存储缓冲溶液中移开，并将每个电极放入包含200 μ l生物素化的HBsAg之小鼠单克隆抗体溶液（来自步骤4.9）的微管中，并在室温下温育5分钟。

4.14. 当完成4.13时，将感应电极从包含生物素化抗体的溶液的微管中移开，并将放入包含已知的HBsAg浓度样品的微管中（来自步骤4.8），然后将带感应电极的微管放入热混合器中并在37±1℃下连续混合10分钟。

20 4.15. 当完成4.14时，将感应电极从包含样品的微管中移开，并放入包含过氧化酶-缀合HBsAg之小鼠单克隆抗体的微管中（来自步骤4.10），然后放入旋转摇动器中并在室温下连续混合5分钟。

25 4.16. 当完成4.15时，将感应电极从微管移开，在0.01M磷酸盐缓冲溶液中冲洗3 - 5秒，并将每个电极放入充满工作缓冲溶液N°1的微量滴定板的浇口窝中。

4.17. 将感应电极和参比电极连接到与基于PC的测量仪器相连的支架的电触点上，并将该支架定位在充满N°1工作缓冲溶液微量滴定板浇口窝的上方，以使感应电极和参比电极浸入该溶液中。

30 4.18. 启动该常规软件，并用来记录50秒的时间感应电极电势相对于参比电极电势的毫伏数。

4.19. 完成4.18后，以类似于在4.17中所述的方式，将该支架定位在充满N°2工作缓冲溶液的微量滴定板浇口窝之上。

4.20. 用该常规软件记录100秒的时间感应电极电势相对于参比电极

电势变化的毫伏数。

4.21. 使用该常规软件，计算该感应电极的本底电势和最后电势之差（ δ ）。

5 4.22. 使用在4.8步骤中制备的已知浓度的HBsAg样品，顺序重复在
4.17 - 4.21中所述的操作。

4.23. 基于在步骤4.22所得的结果，使用该常规软件绘制“ δ 相对于样
品中HBsAg浓度”的校准曲线。

4.24. 如2.24中所述，制备一系列稀释的血清样品。

10 4.25. 使用在4.13 - 4.21步骤中所述的步骤测定在4.24中所制备每个
稀释样品的HBsAg浓度，使用这些结果加之在步骤4.23中所得的校准曲线，计
算在血清样品中原有的（未冲淡的）HBsAg浓度。

实施例5

15 HBsAg测定；夹层结构分析法；样品-已知HBsAg浓度的样品；受体-生物
素化的HBsAg之小鼠单克隆抗体；标记的HBsAg之小鼠单克隆抗体；标记物-过
氧化酶；“顺序分析”。

5.1. 进行在1.1 - 1.4中所述的过程。

5.2. 用于吡咯电化学聚合的溶液如2.2中所述制备。

5.3. 聚吡咯膜如在2.3中所述由电化学沉积形成。

20 5.4. 将涂有聚吡咯膜的感应电极从浇口窝处移走，用去离子水冲洗，随
后用0.01M磷酸盐缓冲溶液（pH值7.4）冲洗，并放入含300 μ l存储溶液的微管
中，将其在+4℃下储存。

5.5. 重复在5.1 - 5.4中所述的过程，得到需要数量的感应电极。

5.6. 抗生蛋白链菌素的溶液如2.6中所述配制。

25 5.7. 如2.7中所述，将抗生蛋白链菌素结合于覆在该感应电极的聚吡咯
膜的表面上。

5.8. 一系列已知HBsAg浓度的样品如1.10中所述制备。

30 5.9. 将0.5ml生物素化的HBsAg之小鼠单克隆抗体的溶液加到19.5ml的
0.01M磷酸盐缓冲溶液中，在一种旋转的摇动器中完全混合，然后以200 μ l等
分至微管中。

5.10. 将1.7ml过氧化酶标记的HBsAg之小鼠单克隆抗体的溶液加到
18.3ml的0.01M磷酸盐缓冲溶液中，在一种轨道式摇动器中完全混合，然后以

200 μ l等分至微管中。

- 5.11. 工作缓冲溶液N°1如4.11中所述的配制。
- 5.12. 工作缓冲溶液N°2如4.22中所述的配制。
- 5.13. 将涂有含结合抗生蛋白链菌素的聚吡咯膜的感应电极从存储缓冲溶液中移开，并将每个电极放入包含生物素化的HBsAg之小鼠单克隆抗体溶液（来自步骤5.9）的微管中，并在室温下温育5分钟。
- 5.14. 与步骤5.13同时，将10 μ l适当滴定量购买的过氧化酶-标记的HBsAg之小鼠单克隆抗体加到包含已知的HBsAg浓度样品的样品中（来自步骤5.8），首先从样品中移走10 μ l，然后将微管和样品放入热混合器中，并在37±1 °C下保持5 - 10分钟。
- 5.15. 当完成5.13 - 5.14时，将感应电极从包含生物素化抗体的溶液中移开，并放入包含已知HBsAg浓度样品的微管中（来自步骤5.14），然后将其放入热混合器中，并在37±1 °C下连续混合15分钟。.
- 5.16. 当完成5.15时，将感应电极从微管移开，在0.01M磷酸盐缓冲溶液中冲洗3 - 5秒，并将每个电极放入充满工作缓冲溶液N°1的微量滴定板的浇口窝中。
- 5.17. 将感应电极和参比电极连接到与基于PC的测量仪器相连的支架的电触点上，并将该支架定位在充满N°1工作缓冲溶液微量滴定板浇口窝的上方，以使感应电极和参比电极浸入该溶液中。
- 5.18. 启动该常规软件，并用来开始记录50秒的时间感应电极电势相对于参比电极电势的毫伏数。
- 5.19. 当完成5.18时，以类似于在5.17中所述的方式，将该支架定位在充满N°2工作缓冲溶液的微量滴定板浇口窝之上。
- 5.20. 用该常规软件记录200秒的时间感应电极电势相对于参比电极电势变化的毫伏数。
- 5.21. 使用该常规软件，通过感应电极电势变化对参比电极电势的所述曲线，计算S_i（积分的）面积。
- 5.22. 使用在步骤5.8中制备的已知浓度的HBsAg样品，顺序重复在5.17 - 5.21中所述的操作。
- 5.23. 基于在步骤5.22所得的结果，使用该常规软件绘制“S_i对样品中HBsAg浓度”的校准曲线。
- 5.24. 如2.24中所述，制备一系列稀释的血清样品。

5.25. 使用在5.13 - 5.21步骤中所述的步骤，测定在5.24中所制备每个稀释样品的HBsAg浓度，使用这些结果加之在步骤5.23中所得的校准曲线，计算在血清样品中原有的（未冲淡的）HBsAg浓度。

实施例6

5 HBsAg测定；夹层结构分析法；样品-已知HBsAg浓度的样品；受体-生物素化的HBsAg之小鼠单克隆抗体；标记的HBsAg之小鼠单克隆抗体；标记物-过氧化酶；“一锅分析法”。

6.1. 进行在1.1 - 1.4中所述的过程。

6.2. 用于吡咯电化学聚合的溶液如2.2中所述制备。

10 6.3. 聚吡咯膜如在2.3中所述由电化学沉积形成。

6.4. 将涂有聚吡咯膜的感应电极从浇口窝处移走，用去离子水冲洗，随后用0.01M磷酸盐缓冲溶液（pH值7.4）冲洗，并放入含300μl存储溶液的微管中，将它在+4℃下储存。

6.5. 重复在6.1 - 6.4中所述的过程，得到需要数量的感应电极。

15 6.6. 抗生蛋白链菌素的溶液如2.6中所述配制。

6.7. 如2.7中所述，将抗生蛋白链菌素结合于覆在该感应电极的聚吡咯膜的表面上。

6.8. 一系列已知HBsAg浓度的样品如1.10中所述制备。

20 6.9. 将2.5ml合适滴定量的生物素化的HBsAg之小鼠单克隆抗体的溶液加到17.5ml的0.01M磷酸盐缓冲溶液中，在一种旋转摇动器中完全混合，然后以200μl等分至微管中。

6.10. 将1.7ml适当滴定量的购买的过氧化酶标记的HBsAg之小鼠单克隆抗体的溶液加到18.3ml的0.01M磷酸盐缓冲溶液中，在一种旋转摇动器中完全混合，然后以200μl等分至微管中。

25 6.11. 工作缓冲溶液N°1如4.11中所述的配制。

6.12. 工作缓冲溶液N°2如4.22中所述的配制。

6.13. 将10μl生物素化的HBsAg之小鼠单克隆抗体的溶液（来自步骤6.9）和10μl过氧化酶标记的HBsAg之小鼠单克隆抗体（来自步骤6.10）加到每个包含已知HBsAg浓度的样品中，首先从样品中移走20μl，然后将微管和样品放入热混合器中，并在37±1℃下连续混合温育10分钟。,

30 6.14. 当完成6.13时，将涂有含结合抗生蛋白链菌素的聚吡咯膜的感应电极从存储缓冲溶液中移开，并将每个电极放入包含已知的HBsAg浓度样品

的微管中（来自步骤6.13），然后放入热混合器中，并在37±1°C下连续混合5分钟。

6.15. 当完成6.14时，将感应电极从微管移开，在0.01M磷酸盐缓冲溶液中冲洗3 - 5秒，并将每个电极放入充满工作缓冲溶液N°1的微量滴定板的5浇口窝中。

6.16. 将感应电极和参比电极连接到与基于PC的测量仪器相连的支架的电触点上，并将该支架定位在充满N°1工作缓冲溶液微量滴定板浇口窝的上方，以使感应电极和参比电极浸入该溶液中。

6.17. 启动该常规软件，并用来开始记录100秒的时间感应电极电势相对于参比电极电势的毫伏数。10

6.18. 当完成6.17时，以类似于在6.16中所述的方式，将该支架定位在充满N°2工作缓冲溶液的微量滴定板浇口窝之上。

6.19. 用该常规软件记录200秒的时间感应电极电势相对于参比电极电势变化的毫伏数。

6.20. 使用该常规软件，通过感应电极电势变化对参比电极电势的所述曲线，计算S₂（积分的）面积。15

6.21. 使用在步骤6.8中制备的已知浓度的HBsAg样品，顺序重复在6.16 - 6.20中所述的操作。

6.22. 基于在步骤6.21所得的结果，使用该常规软件绘制“S₂对样品20 HBsAg浓度”的校准曲线。

6.23. 如2.24中所述，制备一系列稀释的血清样品。

6.24. 使用在6.13 - 6.21步骤中所述的过程，测定在6.23中所制备的每个稀释样品的HBsAg浓度，使用这些结果加之在步骤6.22中所得的校准曲线，计算在血清样品中原有的（未冲淡的）HBsAg浓度。25

实施例7

胰岛素测定；竞争分析法；样品-已知胰岛素浓度的样品；受体-生物素化的胰岛素之小鼠单克隆抗体；竞争分子-标记的多克隆山羊抗小鼠免疫球蛋白G抗体；标记物-脲酶。

7.1. 进行在1.1 - 1.3中所述的过程。

7.2. 胰岛素之小鼠单克隆抗体的生物素化如1.4中所述进行。将该生物素化的胰岛素之小鼠单克隆抗体的产物溶液分成小容量等分（约10μl），并在30 +4°C下储存。

7.3. 用于吡咯电化学聚合的溶液如2.2中所述制备。

7.4. 聚吡咯膜如在2.3中所述由电化学沉积形成。

7.5. 将涂有聚吡咯膜的感应电极从浇口窝处移走，用去离子水冲洗，随后用0.01M磷酸盐缓冲溶液(pH值7.4)冲洗，并放入含300 μ l存储溶液的微管中，将其在+4℃下储存。
5

7.6. 重复在7.4 - 7.5中所述的过程，得到需要数量的感应电极。

7.7. 抗生蛋白链菌素的溶液如2.6中所述配制。

7.8. 如2.7中所述，将抗生蛋白链菌素结合于覆在该感应电极的聚吡咯膜的表面上。
10

7.9. 一系列已知胰岛素浓度的样品制备如下：
将1.12g氯化钾和1.0g牛血清白蛋白溶于100ml的去离子水中；
将100 μ l冷冻的胰岛素溶于200 μ l所得的溶液中；
将所得的胰岛素溶液顺序地用含氯化钾的去离子水和牛血清白蛋白以
10、20、50、100、1000、5000和10000倍的稀释倍数稀释；
15 每一稀释样品放入分开的200 μ l等分微管中。

7.10. 将0.8ml合适滴定量的生物素化的胰岛素之小鼠单克隆抗体的溶液加到19.2ml的0.01M磷酸盐缓冲溶液中，在一种旋转摇动器中完全混合，然后以200 μ l等分至微管中。

7.11. 将0.02 ml购买的脲酶缀合的小鼠免疫球蛋白G之山羊多克隆抗体加到19.98ml的0.01M磷酸盐缓冲溶液中，在一种旋转的摇动器中完全混合，并以200 μ l等分至微管中。
20

7.12. 通过在200ml的去离子水中溶解2.24g氯化钠配制N°1工作缓冲溶液。

7.13. 通过在20m1N°1工作缓冲溶液中溶解0.012g尿素配制工作缓冲溶液N°2。
25

7.14. 将涂有含结合抗生蛋白链菌素的聚吡咯膜的感应电极从存储缓冲溶液中移开，并将每个电极放入含生物素化的胰岛素之小鼠单克隆抗体溶液(来自步骤7.10)的微管中，并温育10分钟。

7.15. 当完成7.14时，将感应电极从包含生物素化抗体的溶液中移开，并放入包含已知胰岛素浓度样品的微管中(来自步骤7.9)，然后放入热混合器中，并在37±1℃下连续混合15分钟。
30

7.16. 当完成7.15时，将感应电极从包含样品的微管中移开，并放入

包含脲酶缀合小鼠免疫球蛋白G之山羊多克隆抗体溶液（来自步骤7.11）的微管中，然后放入旋转摇动器中，并在室温下连续混合10分钟。

7.17. 当完成7.16时，将感应电极从微管移开，在含氯化钾的去离子水和牛血清白蛋白中冲洗3 - 5秒，并将每个电极放入充满工作缓冲溶液N°1的微量滴定板的浇口窝中。
5

7.18. 将感应电极和参比电极连接到与基于PC的测量装置相连的支架的电触点上，并将该支架定位在充满N°1工作缓冲溶液微量滴定板浇口窝的上方。
10

7.19. 启动该常规软件，并用来开始记录200秒的时间感应电极电势相对于参比电极电势的毫伏数。
10

7.20. 当完成7.19时，以类似于在7.18中所述的方式，将该支架定位在充满N°2工作缓冲溶液的微量滴定板浇口窝之上。
15

7.21. 用该常规软件记录400秒的时间感应电极电势相对于参比电极电势变化的毫伏数。
15

7.22. 使用该常规软件，通过感应电极电势变化对参比电极电势的所述曲线，计算S₂（积分的）面积。
20

7.23. 使用在步骤7.9中制备的已知浓度的胰岛素样品，顺序重复在7.18 - 7.22中所述的操作。
20

7.24. 基于在步骤7.23所得的结果，使用该常规软件绘制“S₂对样品中胰岛素浓度”的校准曲线。
25

实施例8

核酸杂化反应。

8.1. 进行在1.1 - 1.3中所述的过程。

8.2. 用于吡咯电化学聚合的溶液如2.2中所述制备。

8.3. 聚吡咯膜如在2.3中所述由电化学沉积形成。

8.4. 将涂有聚吡咯膜的感应电极从浇口窝处移走，用去离子水冲洗，随后用0.01M磷酸盐缓冲溶液（pH值7.4）冲洗，并放入含300μl存储溶液的微管中，将其在+4℃下储存。
25

8.5. 重复在8.3 - 8.4中所述的过程，得到需要数量的感应电极。

8.6. 通过在200ml的去离子水中溶解一片磷酸盐缓冲片，并在所得溶液中溶解5.0 mg抗生素蛋白链菌素，配制抗生素蛋白链菌素溶液。
30

8.7. 如下所述，将抗生素蛋白链菌素结合于覆在该感应电极的聚吡咯膜的

表面上：

将抗生蛋白链菌素溶液等分至300 μ l微管中；

将涂有聚吡咯膜的感应电极从存储缓冲溶液中移开，将每个电极放入包含抗生蛋白链菌素溶液的微管中，并在+4℃下温育24小时；

5 将感应电极从包含抗生蛋白链菌素溶液的微管中移开，用0.01M的磷酸盐缓冲溶液冲洗，并用含0.01%叠氮化钠的去离子水冲洗两次，然后将每个感应电极放入存储缓冲溶液中，并在+4℃下储存。

8.8. 单股DNA探针溶液制备如下：

10 将1 mg冷冻的生物素化双股DNA探针制剂（长度约1kb）溶于1ml去离子水中，并将所得的溶液放入微管中；

将包含DNA探针溶液的微管放入水浴中，将其在+100℃下温育5-8分钟；

将包含DNA探针溶液的微管转入含有冰的容器中，将其迅速冷却至0℃；然后将包含DNA探针溶液的微管转入冰箱中，将其在-20℃下冷冻储存。

8.9. 与生物素化的DNA探针互补的单股DNA的溶液制备如下：

15 将10 mg冷冻的与生物素化DNA探针互补的双股DNA制剂溶于1ml去离子水中，并将所得的溶液放入微管中；

将包含DNA溶液的微管放入水浴中，将其在+100℃下温育5-8分钟；

将包含DNA溶液的微管转入含有冰的容器中，将其迅速冷却至0℃；然后将包含DNA溶液的微管转入冰箱中，将其在-20℃下冷冻储存。

20 8.10. 与生物素化DNA探针非互补的单股DNA溶液如8.9所述制备。

8.11. 工作缓冲溶液N°1配制如下：

将一片磷酸盐缓冲片溶解于200ml的去离子水中；

将2g牛血清白蛋白、0.37g氯化钾和0.12g柠檬酸钠溶于所得的溶液中。

8.12. 工作缓冲溶液N°2配制如下：

25 将一片磷酸盐缓冲片溶解于200ml的去离子水中；

将2g牛血清白蛋白和1g葡聚糖硫酸钠溶于所得的溶液中。

8.13. 将涂有含结合抗生蛋白链菌素的聚吡咯膜的感应电极从包含0.01%叠氮化钠和0.15M氯化钾的去离子水移开，并将20 μ l预先解冻并温至室温的单股DNA探针溶液涂敷至每个感应电极工作表面上。

30 8.14. 当完成8.13时，将感应电极放入可调湿度室，在+44℃下温育60分钟。

8.15. 当完成8.14时，将感应电极从可调湿度室移开，并将每个电极

放入包含 $200\mu\text{l}$ 用于DNA杂化反应的初始缓冲溶液的微管中，将它们在 $+4^\circ\text{C}$ 下保持一个短时期。（DNA杂化反应缓冲液可以是本领域已知的任何标准杂化反应缓冲液，参见Sambrook, J., Fritsch, E. F. 和Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor 5 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 美国）

8.16. 包含与生物素化DNA探针互补的单股DNA的样品制备如下：

将 10mg 冷冻的来自鲑鱼精液DNA制剂溶于 10ml 用于DNA杂化反应的初始缓冲溶液中；

将 $10\mu\text{l}$ 预先解冻并温至室温的与生物素化DNA-探针互补的单股DNA溶液加至 0.99ml 所得的溶液中；

将所得溶液在旋转摇动器中完全混合，并等分至 $200\mu\text{l}$ 微管中。

8.17. 包含与生物素化DNA探针非互补的单股DNA样品制备如下：

将 10mg 来自鲑鱼精液的冷冻DNA制剂溶于 10ml 用于DNA杂化反应的初始缓冲溶液中；

将 $100\mu\text{l}$ 预先解冻并温至室温的与生物素化DNA探针非互补的单股DNA溶液加至 0.9ml 所得的溶液中；

将所得溶液在旋转摇动器中完全混合，并等分至 $200\mu\text{l}$ 微管中。

8.18. 将半数含被固定的生物素化单股DNA探针的感应电极从包含用于DNA杂化反应初始的缓冲溶液的微管中移开，并放入含有包含DNA互补至生物素化DNA-探针的样品的微管中；然后将包含感应电极的微管放入热混合器中，并在 $+42^\circ\text{C}$ 下连续混合120分钟。20

8.19. 当完成8.18时，将感应电极从微管移开，在工作缓冲溶液N°1中冲洗3 - 5秒，并将每个电极放入充满工作缓冲溶液N°1的浇口窝中。

8.20. 将感应电极和参比电极连接到与基于PC的测量装置相连的支架的电触点上，并将该支架定位在充满N°1工作缓冲溶液微量滴定板浇口窝的上方，以使感应电极和参比电极浸入该溶液中。25

8.21. 启动该常规软件，并用来开始记录200秒的时间感应电极电势相对于参比电极电势的毫伏数。

8.22. 当完成8.21时，以类似于在8.20中所述的方式，将该支架定位在充满N°2工作缓冲溶液的微量滴定板的浇口窝之上。30

8.23. 使用该常规软件记录600秒的时间感应电极电势相对于参比电极电势变化的毫伏数。

8.24. 使用该常规软件，计算本底电势和最后电势之差（ δ ）。

8.25. 使用在步骤4.8中制备的与生物素化DNA探针互补的DNA样品，顺序重复在8.20-8.24中所述的操作。

8.26. 将另外半数含被固定的生物素化单股DNA探针的感应电极从包含用于DNA杂化反应初始的缓冲溶液的微管中移开，并放入含有包含与生物素化DNA探针非互补的DNA样品的微管中，然后将包含感应电极的微管放入热混合器中，并在+42℃下连续混合120分钟。

8.27. 使用包含与生物素化DNA探针非互补的DNA样品，顺序重复在8.19-8.25中所述的过程。

8.28. 基于在8.19-8.26中所得的结果，使用该常规软件绘制由与生物素化DNA探针互补和非互补的DNA样品得到的 δ 值的统计分布曲线。

实施例9

地高新测定；竞争分析法；样品-已知浓度的地高新样品；受体-生物素化的地高新之小鼠单克隆抗体；竞争分子-标记的地高新；标记物-过氧化酶。

9.1. 进行在1.1-1.4中所述的过程。

9.2. 用于吡咯电化学聚合的溶液如2.2中所述制备。

9.3. 聚吡咯膜如在2.3中所述由电化学沉积形成。

9.4. 将涂有聚吡咯膜的感应电极从浇口窝处移走，用去离子水冲洗，随后用0.01M磷酸盐缓冲溶液（pH值7.4）冲洗，并放入含300μl存储溶液的微管中，将其在+4℃下储存。

9.5. 重复在9.1-9.4中所述的过程，得到需要数量的感应电极。

9.6. 抗生蛋白链菌素的溶液如2.6中所述配制。

9.7. 如2.7中所述，将抗生蛋白链菌素结合于覆在该感应电极的聚吡咯膜的表面上。

9.8. 一系列已知地高新浓度的样品制备如下：

将250ml乙醇加至750ml的去离子水中；

将250mg地高新溶于1000ml所得的乙醇溶液中；

将一片磷酸盐缓冲片和10.0g牛血清白蛋白溶解于200ml的去离子水中；在含牛血清白蛋白的PBS溶液中，将所得的地高新溶液以250、2500、25000、50000、125000、250000和500000倍的稀释比例顺序稀释；

将每一稀释样品放入分开的200μl等分微管中。

9.9 将20μl购买的生物素缀合地高新之小鼠单克隆抗体的溶液加到

19. 98ml的0.01M磷酸盐缓冲溶液(pH值7.4)中，在旋转摇动器中完全混合，然后以200 μ l等分至微管中。

5 9.10 根据前述规程，参见[21]，将地高新用过氧化酶缀合。将过氧化酶标记的地高新的产物溶液(最后浓度约0.1mg/ml)用0.01M磷酸盐缓冲溶液(pH值7.4)以10倍的稀释比稀释，然后将其分为小体积等分(10 μ l)，并在+4℃下储存。

9.11. 工作缓冲溶液N°1如4.11中所述的配制。

9.12. 工作缓冲溶液N°2如4.22中所述的配制。

10 9.13. 将涂有含结合抗生素蛋白链菌素的聚吡咯膜的感应电极从存储缓冲溶液中移开，并将每个电极放入包含生物素缀合的地高新之小鼠单克隆抗体溶液(来自步骤9.9)的微管中，并在室温下温育10分钟。

9.14. 与步骤9.13同时，首先从样品中移出2 μ l，然后将2 μ l过氧化酶标记的地高新溶液(来自步骤9.10)加至每一已知的地高新浓度(来自步骤9.8)的样品中。

15 9.15. 当完成9.13和9.14后，将感应电极转入包含过氧化酶标记的和未标记的地高新的试管(来自步骤9.14)；将这些试管加感应电极放入热混合器中，并在37±1℃下连续混合10分钟。.

9.16. 当完成9.15时，将感应电极从微管移开，在0.01M的PBS中冲洗3-5秒，并将每个电极放入充满工作缓冲溶液N°1的微量滴定板的浇口窝中。

20 9.17. 将感应电极和参比电极连接到与基于PC的测量仪器相连的支架的电触点上，并将该支架定位在充满N°1工作缓冲溶液的微量滴定板浇口窝之上，以使感应电极和参比电极浸入该工作缓冲溶液中。

9.18. 启动该常规软件，并用来开始记录30秒的时间感应电极电势相对于参比电极电势的毫伏数。

25 9.19. 当完成9.18时，以类似于在9.17中所述的方式，将该支架定位在充满N°2工作缓冲溶液的微量滴定板浇口窝之上。

9.20. 用该常规软件记录100秒的时间感应电极电势相对于参比电极电势变化的毫伏数。

30 9.21. 使用该常规软件，通过感应电极电势变化对参比电极电势的所述曲线，计算S₂(积分的)面积。

9.22. 使用在步骤9.8中制备的已知浓度的地高新样品，顺序重复在9.17 - 9.21中所述的操作。

9.23. 基于在步骤9.22所得的结果，使用该常规软件绘制“S₂对样品中地高新浓度”的校准曲线。

参考文献

- 5 1. Kasparov S. V., Farmakovsky D. A., Kharlamov A. A., Damiryan A., Damiryan A. U., Remen V. V. 用于检测生物学流体中生物学活性化合物装置和该传感元件的制造方法。俄罗斯联邦专利N 2032908。
- 10 2. Kasparov S. V., Farmakovsky D. A. 电化学免疫测定。WO 96/02001。
- 10 3. Farmakovsky D. A., Milanovsky E. Yu., Cherkasov V. R., Biryukov Yu. S., Komarov B. V. 试液中免疫化学活性高分子的电化学诏示方法。俄罗斯联邦专利N 2107296。
- 15 4. Ge Hailin, Wallace G. G. 聚吡咯的离子交换性质。Reactive polymers, 18, 133 – 140, 1992.
- 15 5. Curtin L. S., Komplin G. C., Pietro W. J., 在聚吡咯膜中的扩散阴离子交换。J. of Physical Chemistry, 92, 12 13, 1988.
- 20 6. Bobacks J. Gao Zh., Ivaska A., Lewenstein. A., p-型导电聚合物的离子机理和和氧化还原敏感性。第2部分。聚吡咯的实验性研究。J. of Electrochemical Chemistry, 368, 33 – 41, 1994.
- 20 7. Scheller F., Pfeiffer D., Schubert F., Renneberg R. Kirstein D., 在真实物体的分析中使用酶测量电流的生物传感器。生物传感器：基本原则和附件。Moscow. Mir, 1992.
- 25 8. Taniguchi I., Yasukouchi K., Tsuji I., 用于免疫传感器的引起电势的元件。EP0 193 154 A2.
- 25 9. Hodgson A. J., Spencer M. J., Wallace G. G., 蛋白质至导电电活性聚合物的引入。Reactive polymers, 18, 77 85, 1992.
- 30 10. John R., Spencer M. J., Wallace G. G., Smyth M. R., 聚吡咯的开发基于人血清白蛋白传感器。Antalytica Chimica Acta, 249, 381 – 385, 1991.
- 30 11. Leary J. J., Brigati D. J., Ward D. C., 用于目测生物素标记的探针杂化至被固定在硝化纤维上的DNA或者RNA的快速与灵敏比色法: bio-blots. Proc. Natl. Academy Science USA, 80, 4045 – 4049, 1983.
12. Rosenstein R., 免疫凝集粒子悬浮液体EP 0 138 297 A1.

13. Schasfoort R. B. M., Bergveld P., Bomer J., Kooyman R. P. H., Greve J., 通过免疫反应调节ISFET响应。Sensors and Actuators, 17, 531-535, 1989.

14. Schasfoort R. B. M. keldermans C. E. J. M., Kooyman R. P. H., Bergveld P., Greve J., 通过离子步骤导致的免疫FET响应对黄体酮的竞争性免疫检测。Sensors and Actuators B1, 368 - 372, 1990.

15. Schasfoort R. B. M., Kooyman R. P. H. Bergveld P. Greve J., 免疫FET操作的新方法。Biosensors and Bioelectronics, 5, 103 - 124, 1990.

16. Bergveld P., 直接蛋白质检测方法的临界评价。Biosensors and Bioelectronics, 6, 55 72, 1991.

17. Hager H. J., 胶乳聚合物试剂用于诊断试验。美国专利3, 857, 931.

18. Spadaro A. M., Engler Ph. V., 试剂涂层粒子的冰冻干燥。EP 0 193 208 B1.

19. Harlow E., Lane D., 抗体：实验规程，Cold Spring Harbor, NY, 1988.

20. Rigby P. J. W., Dieckman M. Rhodes C., Berg R., 通过用DNA polymerase. DNA聚合酶缺口移位标记脱氧核糖核酸至高比放。J. of Molecular Biology, 113, 237-251, 1977. 21. Shan S. Wong, 蛋白质缀合与交联的化学。CRC Press Inc, 1991.

说 明 书 附 图

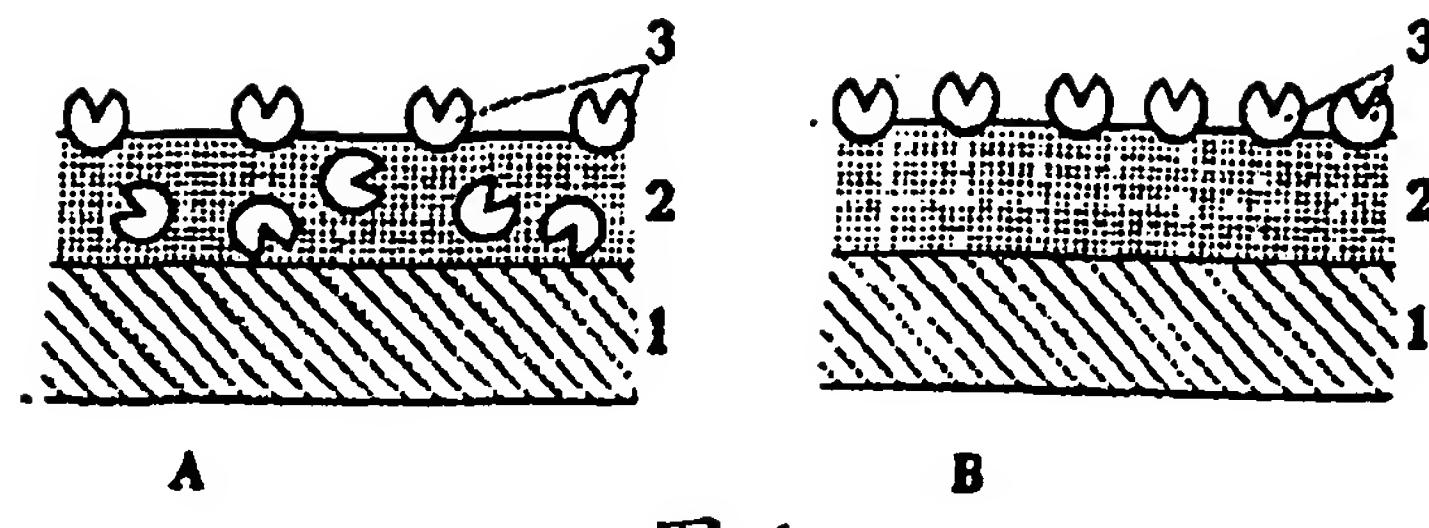


图 1

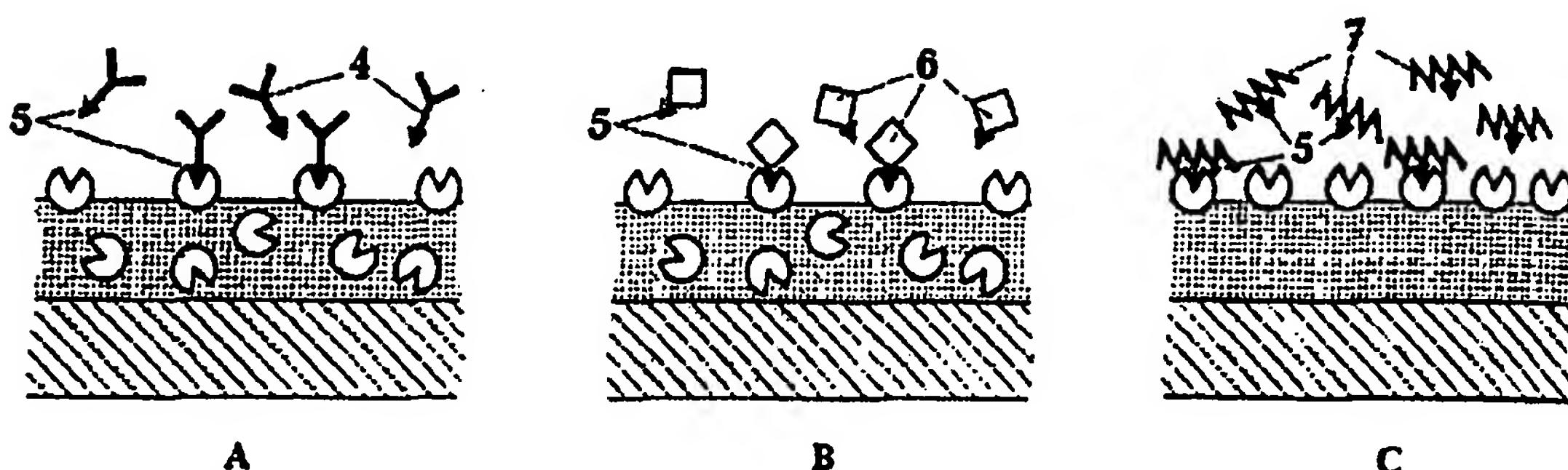


图 2

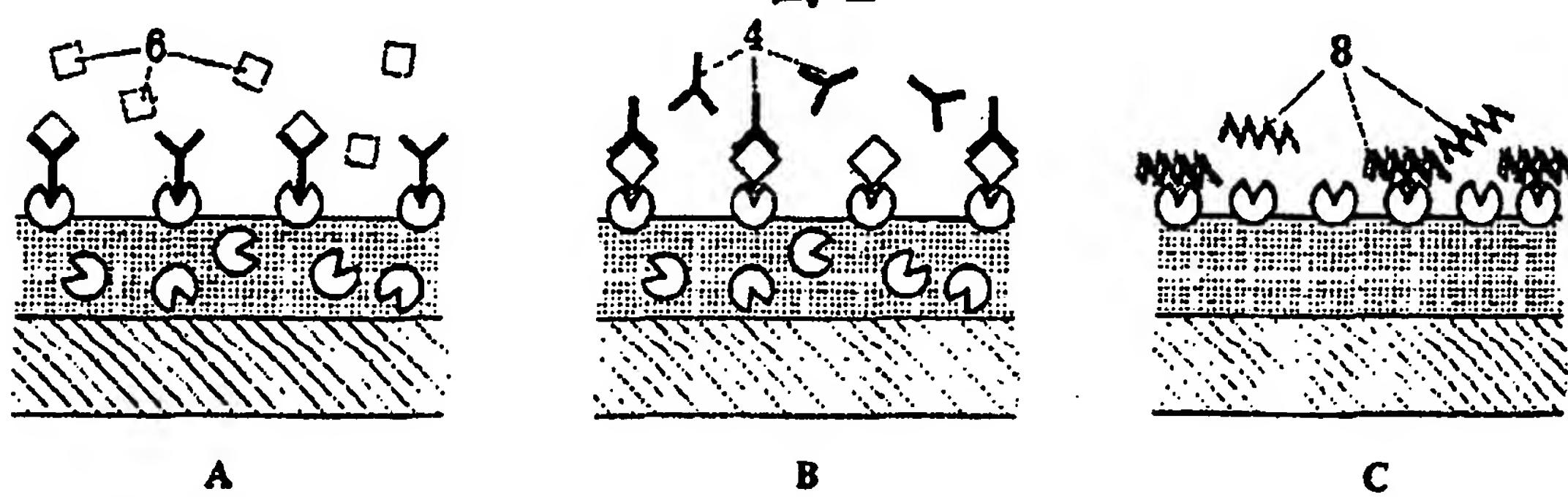


图 3

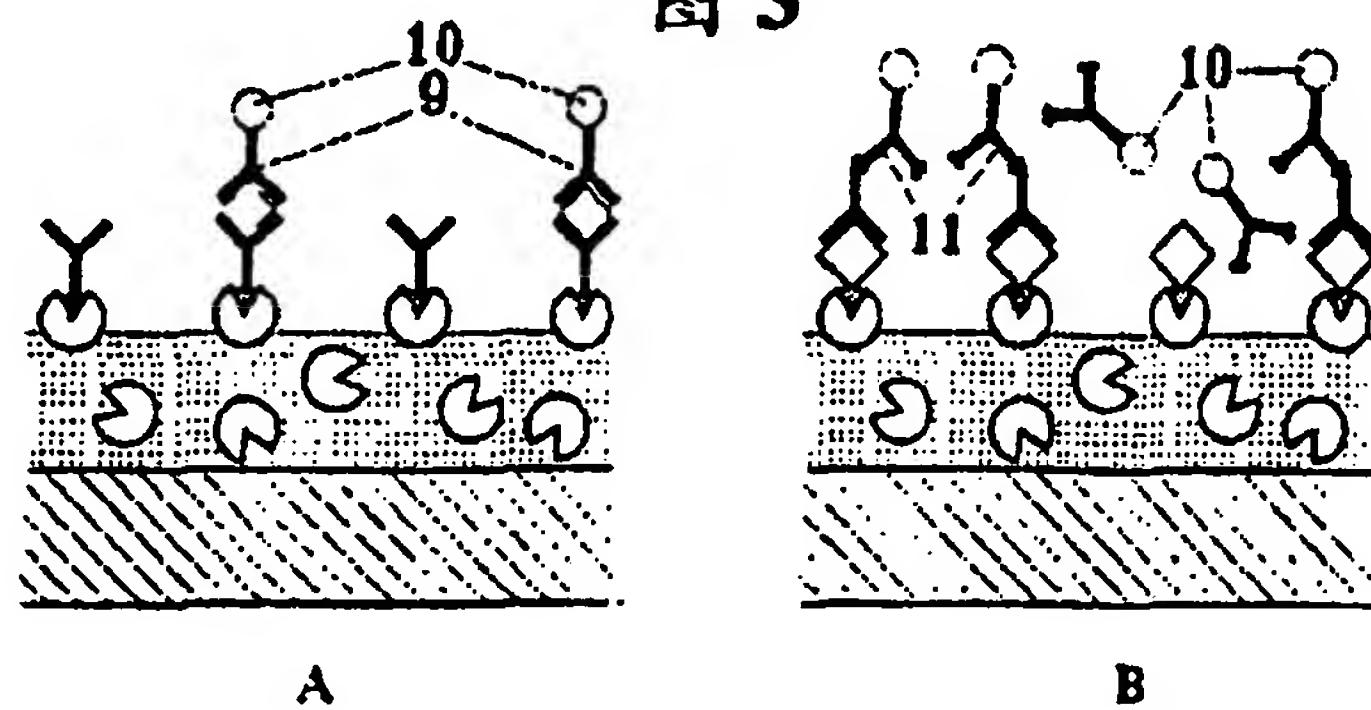


图 4

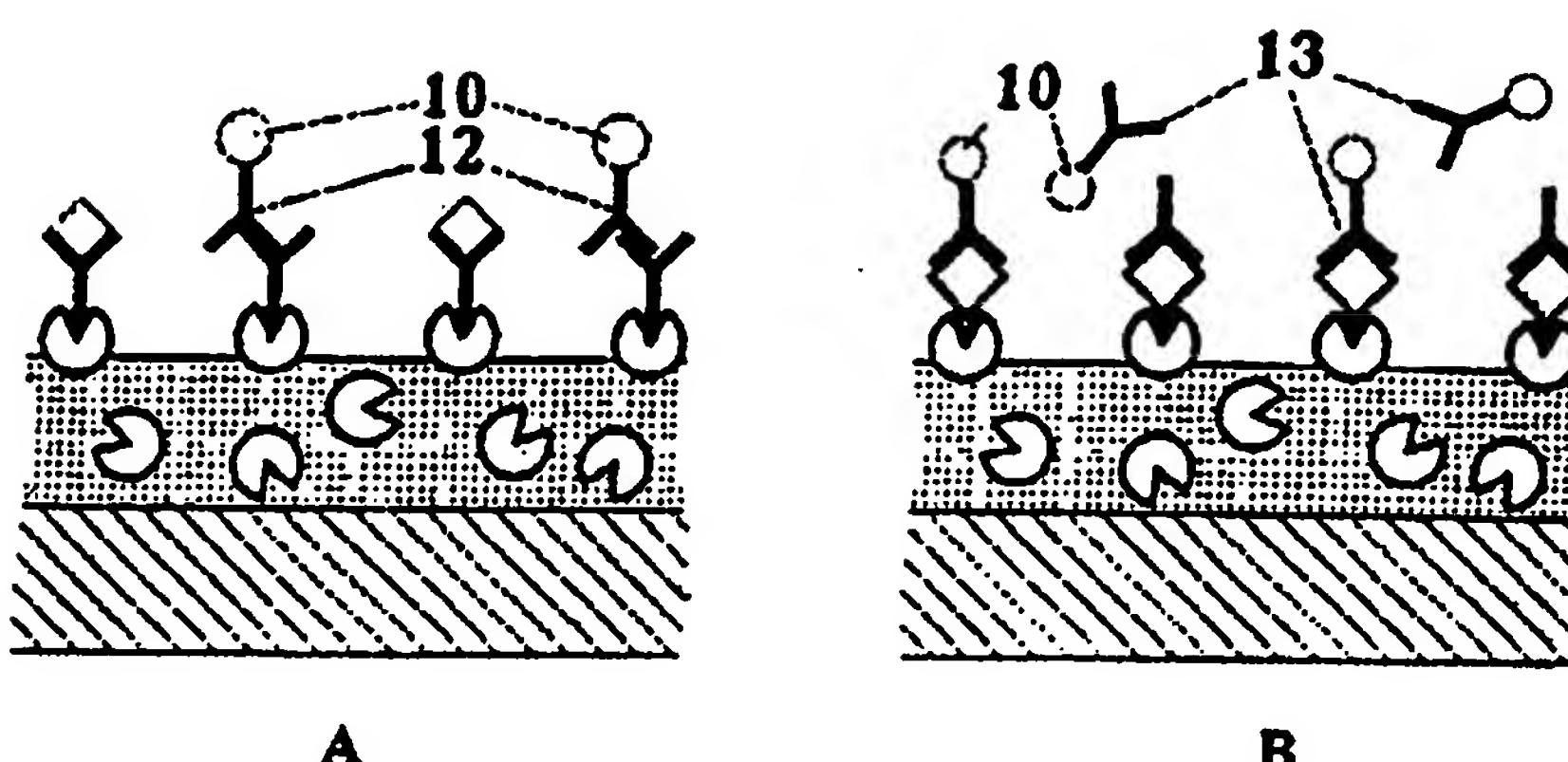


图 5

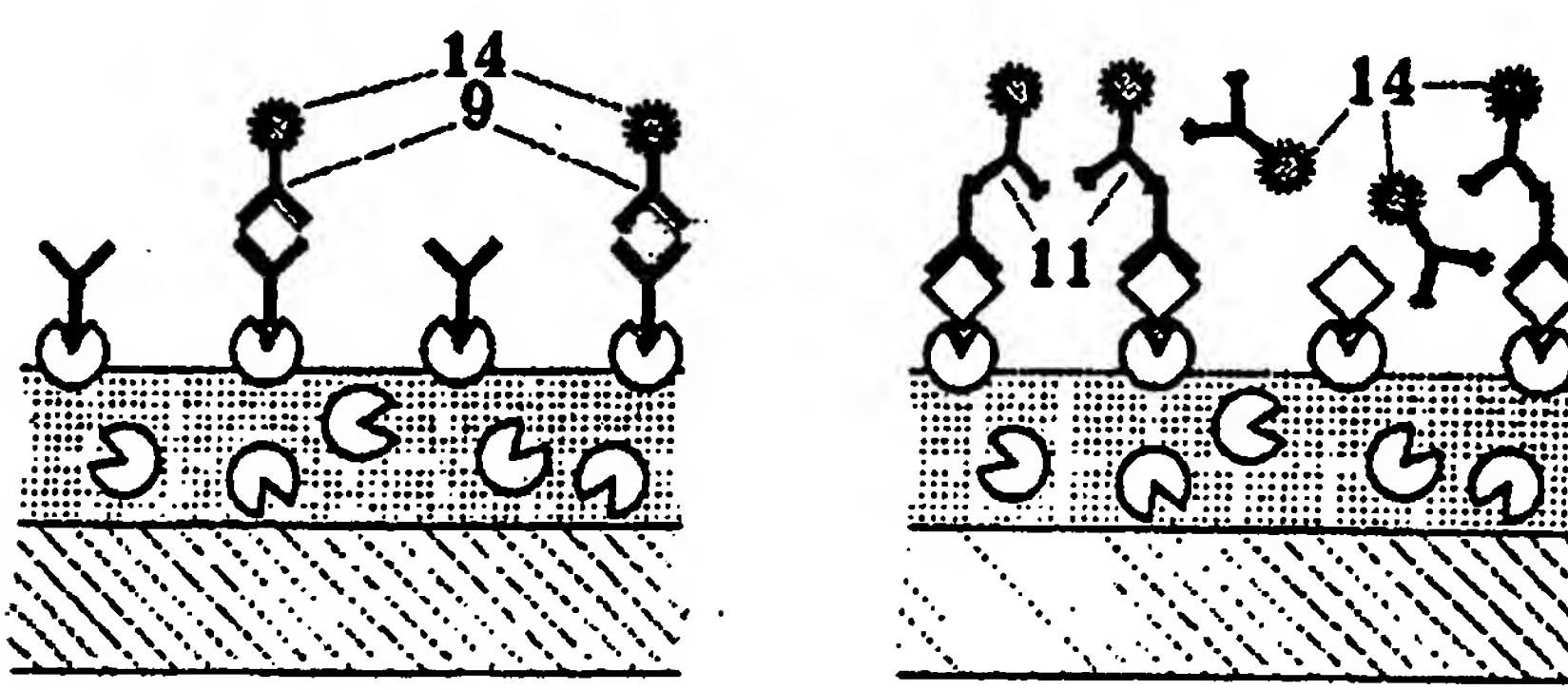


图 6

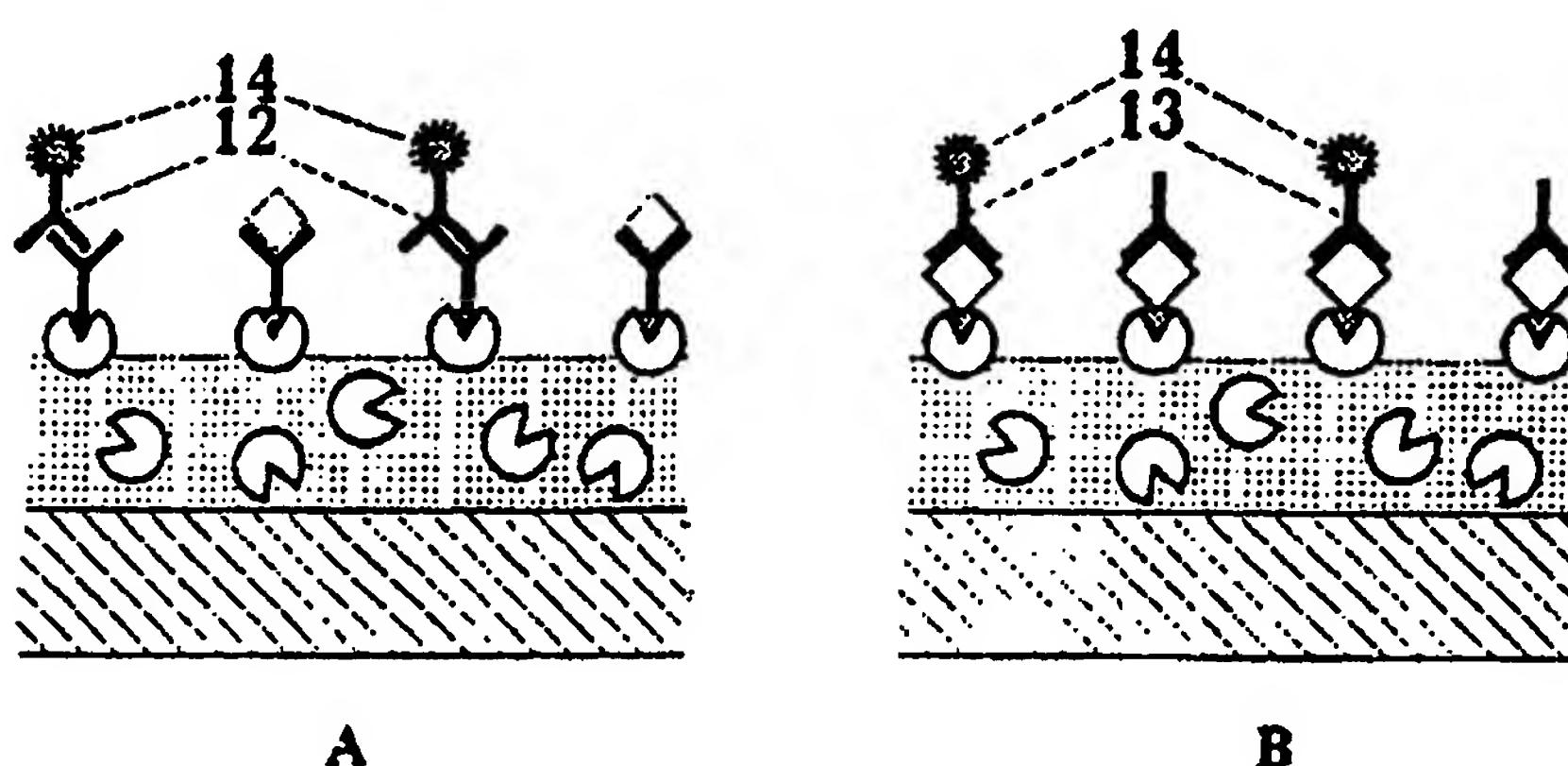


图 7

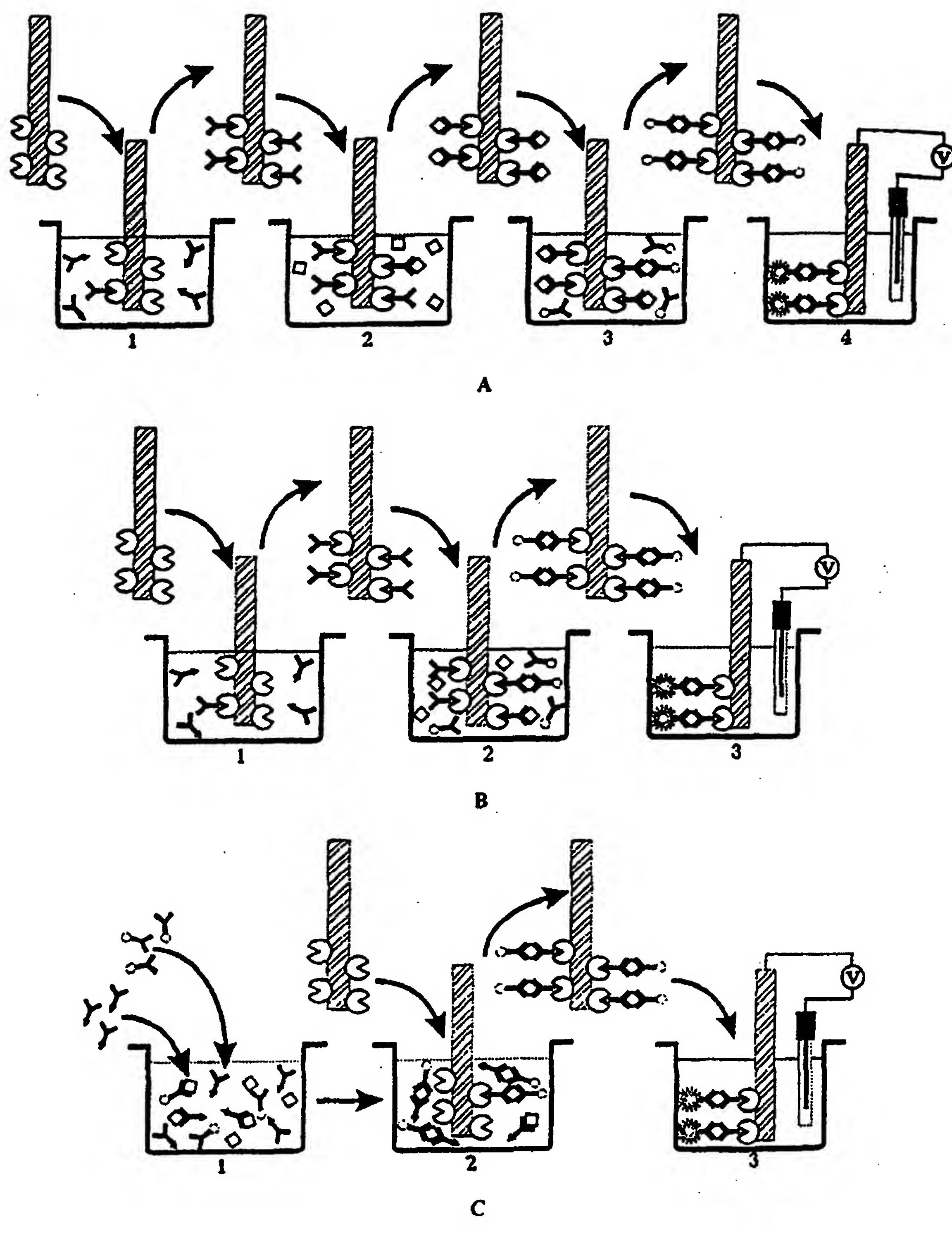


图 8

61-04-24

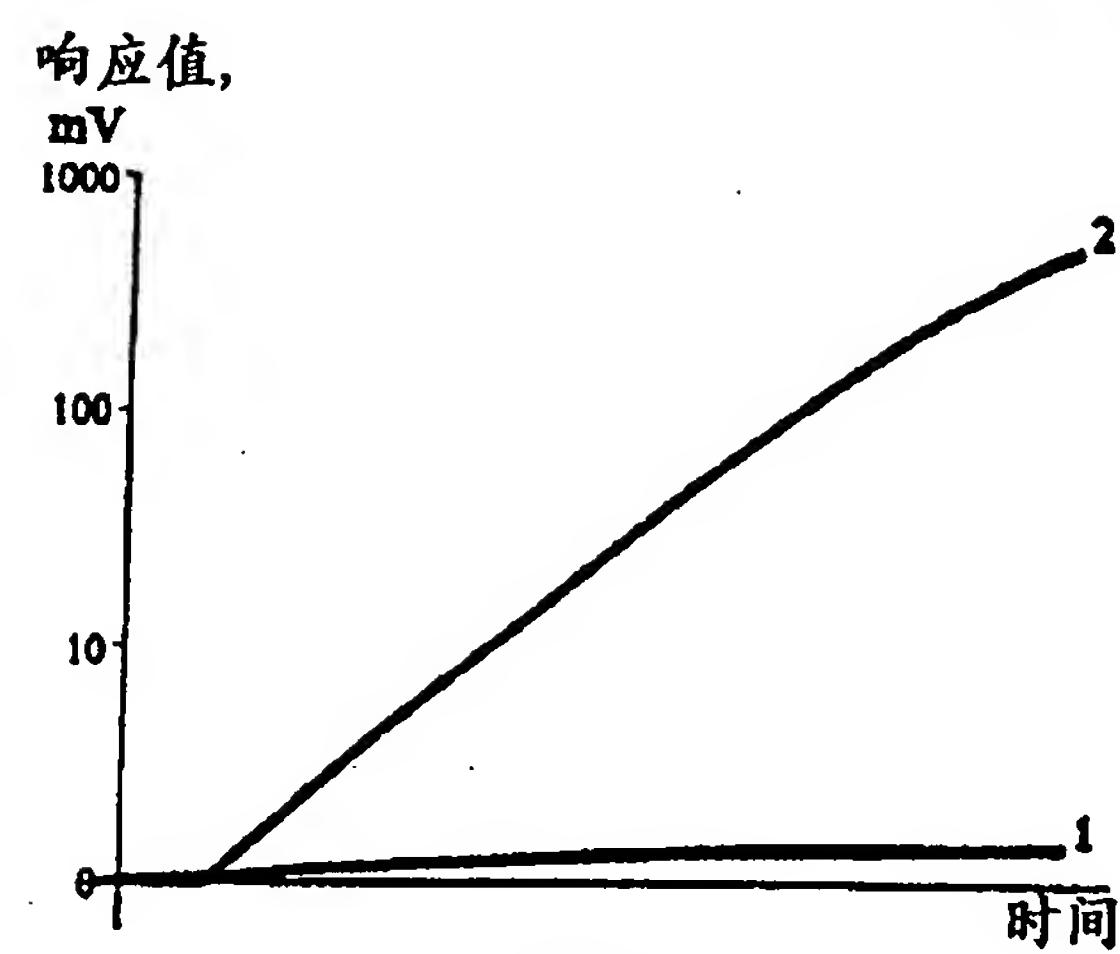


图 9

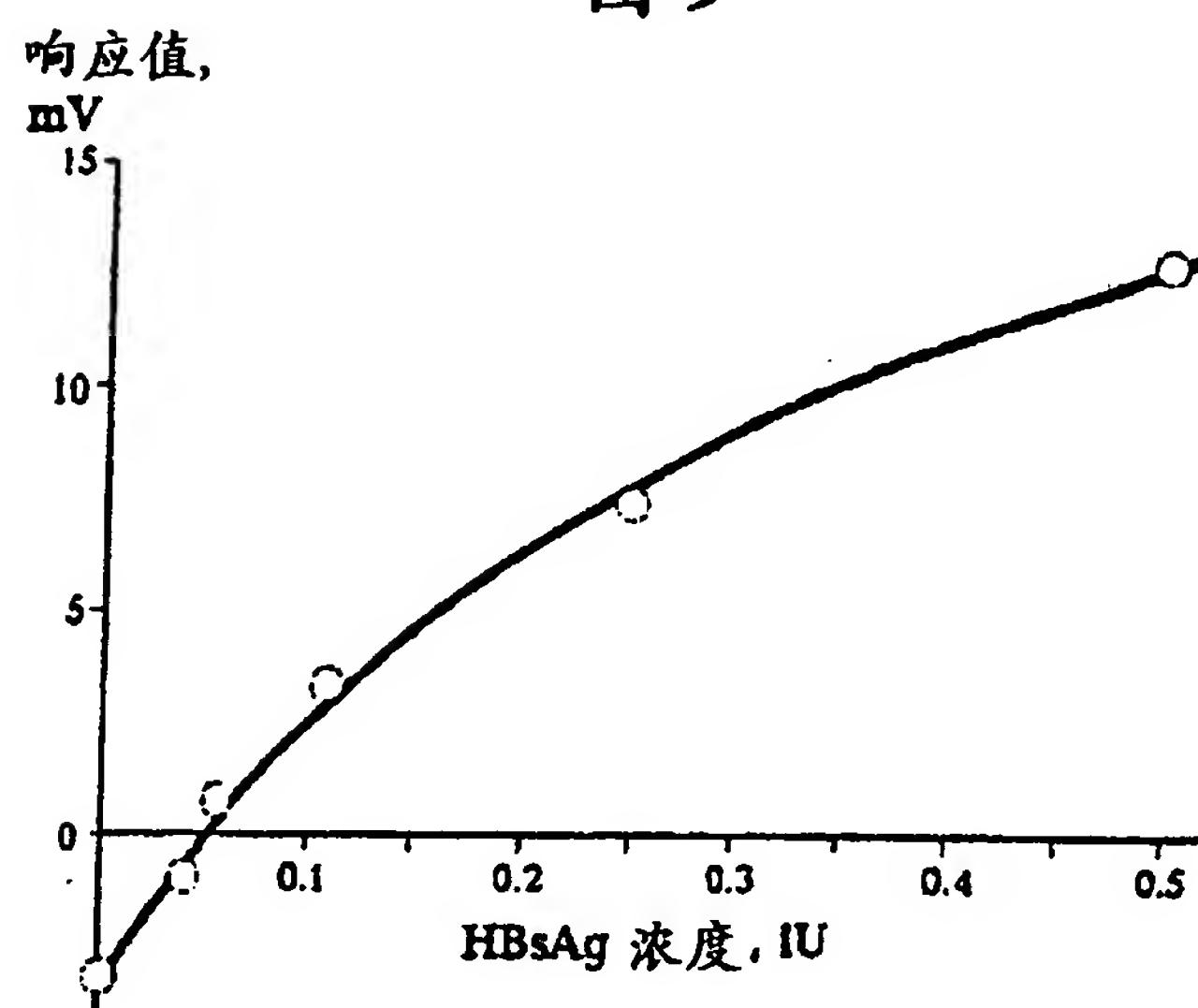


图 10

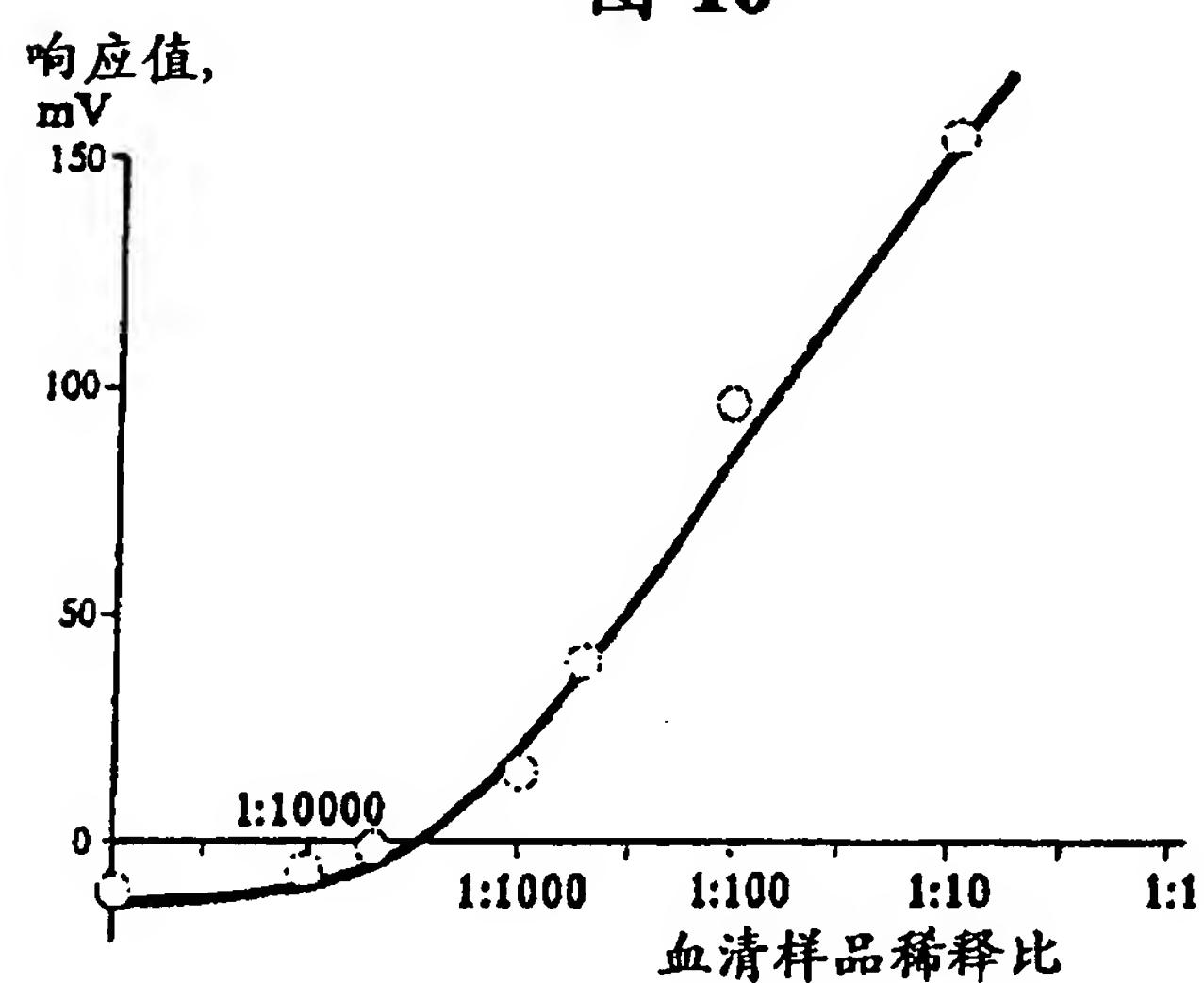


图 11